

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



* 5 3 0 9 5 6 4 8 5 8 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**ESTRUCTURA Y DINÁMICA DE
RIBONUCLEASA A POR RESONANCIA
MAGNÉTICA NUCLEAR BIDIMENSIONAL.**

MEMORIA

que para obtener el grado de Doctor

presenta

José Luis Neira Faleiro

Instituto de Estructura de la Materia, C.S.I.C.

Madrid, 1993

Este trabajo se ha realizado en el grupo de Resonancia Magnética Nuclear del Instituto de Estructura de la Materia del C.S.I.C. bajo la dirección del Dr. Manuel Rico Sarompas.

ÍNDICE

Capítulo I

1.1. Proteínas.

1.2. La Resonancia Magnética Nuclear de proteínas.

1.2.1. La espectroscopía bidimensional de Resonancia Magnética Nuclear (2D-RMN).

1.2.2. Los experimentos bidimensionales de correlación escalar.

1.2.3. Los experimentos bidimensionales de correlación dipolar.

1.3. La ribonucleasa A bovina.

1.3.1. Estructura del enzima.

1.3.2. Plegamiento.

Capítulo II

2.1 Introducción.

2.1.1 Los equilibrios de ionización en proteínas.

2.1.2 Antecedentes en las determinaciones de los equilibrios de ionización en Ribonucleasa A.

2.2. Metodología experimental.

2.2.1. Preparación de las muestras de RMN.

2.2.2. Espectroscopía de RMN.

2.2.3. Cálculo de los valores de los pK_a .

2.3. Resultados

2.3.1. Determinación de los pK_a s de los residuos ionizables de Ribonucleasa A.

Residuos ácidos: equilibrio carboxilo-carboxilato.

Residuos básicos: Histidinas y extremo N-terminal.

2.3.2. Cambios conformacionales con el pH.

El cambio conformacional asociado con la disociación del anillo imidazólico de la His 48.

El cambio conformacional asociado con el extremo C-terminal.

2.3.3. Interacciones iónicas en Ribonucleasa A.

El puente salino Glu 2-Arg 10.

Los puentes de hidrógeno Ser 80 (NH)-Glu 49 (COO⁻) y Ser 50 (NH)-Asp 53 (COO⁻).

El puente de hidrógeno Lys 66 (NH)-Asp 121 (COO⁻).

El puente de hidrógeno His 105 (NH)-Val 124 (COO⁻).

2.3.4. El centro activo

2.3.5. Desnaturalización a pHs ácidos.

Mecanismo de apertura de la hélice e intercambio.

Capítulo III

3.1 Introducción.

3.1.1. Factores que determinan el intercambio de hidrógeno en proteínas globulares.

3.1.2. Determinación de los parámetros cinéticos de activación del proceso de intercambio.

3.1.3. Intercambio de protones peptídicos en el sistema Ribonucleasa. Antecedentes.

3.2. Metodología experimental.

3.2.1. Tratamiento de la muestras.

3.2.2. Obtención y procesado de los espectros de RMN.

3.2.3. Procesado y tratamiento de los datos.

3.2.4. Estimación de errores.

3.2.5. Determinación de las energías libres a partir de datos de intercambio.

3.2.6. Las medidas calorimétricas.

3.3. Resultados.

3.3.1. Intercambio de Ribonucleasa A a pH = 2.5.

Constantes cinéticas de intercambio, factores de protección y energías libres de fluctuación global y local.

Relación de las propiedades de intercambio con rasgos estructurales generales. Enlace de hidrógeno y accesibilidad.

Parámetros de activación.

3.3.2. Intercambio de Ribonucleasa A a pH = 6.0.

Constantes cinéticas de intercambio, factores de protección y energías libres de fluctuación global y local.

Relación de las propiedades de intercambio con rasgos estructurales generales.
Enlace de hidrógeno y accesibilidad.

Parámetros de activación.

3.3.3. Intercambio de Ribonucleasa S a pH = 6.0.

Constantes cinéticas de intercambio, factores de protección y energías libres de fluctuación global y local.

Relación de las propiedades de intercambio con rasgos estructurales generales.
Enlace de hidrógeno y accesibilidad.

Parámetros de activación.

3.3.4. Medidas calorimétricas.

3.3.5. Energías libres de desnaturalización calorimétricas y las deducidas a partir de datos del intercambio H/D. Propiedades del estado desnaturalizado.

Capítulo IV

Resumen y conclusiones.

Apéndice

Bibliografía

Introducción

Para entender en profundidad el mecanismo por el que una proteína funcional lleva a cabo su acción biológica es imprescindible conocer su estructura tridimensional a nivel atómico. Hasta una época relativamente reciente, ello era posible únicamente mediante la técnica de difracción de Rayos X sobre monocristales. En la última década, la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear se ha consolidado como una técnica alternativa para la determinación de estructuras tridimensionales de proteínas, con la ventaja añadida de que estas determinaciones se realizan en disolución acuosa, es decir, en un medio muy similar a las condiciones que prevalecen "in vivo". Los resultados obtenidos por difracción de Rayos X de monocristales nos presentaban una visión rígida de la estructura de las proteínas, que pronto fue reemplazándose por una imagen dinámica mucho más apropiada para la explicación de una variedad de importantes fenómenos involucrados en la actividad biológica de las proteínas, tales como efectos de empaquetamiento transitorios que permiten la entrada de metabolitos al interior de la proteína, interacciones de ligandos y sustratos en el sitio activo, efectos alostéricos y muchos otros. En la actualidad, ya nadie duda que, para comprender la función de las proteínas, es preciso no sólo conocer su estructura sino también la dinámica de fluctuaciones estructurales y su relación con eventuales cambios conformacionales que tengan lugar durante el proceso de ejecución de su actividad biológica.

Uno de los mayores problemas en Química y Biología pendientes de ser resueltos es el del plegamiento de proteínas cuya resolución habría de permitir predecir la estructura tridimensional, funcionalmente activa, de una proteína a partir de su secuencia de aminoácidos. Las bases químico-físicas del plegamiento, teórico o empíricas, no se conocen con el suficiente grado de detalle como para que las predicciones sean efectivas. Para la resolución de este problema hay que considerar conjuntamente no sólo el por qué se llega a la estructura nativa (termodinámicamente más estable que la forma desnaturalizada en condiciones ordinarias) sino cómo se llega a ella, es decir la cinética de plegamiento. Ello requiere la caracterización estructural y dinámica de los estados inicial y final, la de los posibles "intermediarios" en el plegamiento y la del estado de transición. En el presente estudio hemos dirigido nuestra atención a la caracterización estructural y dinámica de los estados nativo y desnaturalizado, mediante la utilización de la técnica de Espectroscopía de RMN bidimensional.

Ello no significa que se haya renunciado a la obtención de información estructural acerca de intermediarios como más adelante podrá comprobarse. Nuestra concentración en los estados inicial y final del plegamiento (o nativo y desnaturalizado, respectivamente) y principalmente en lo que se refiere en sus propiedades frente al intercambio, radica en el convencimiento de que este conocimiento es esencial para una eventual interpretación de

experimentos cinéticos de etiquetado por pulsos en términos de estructura de intermediarios.

La aplicación de la espectroscopía de RMN al estudio de proteínas (≤ 20 KDalton) puede dividirse en tres etapas: (1) asignación de resonancias protónicas a núcleos concretos; (2) determinación de la estructura tridimensional y (3) estudios dinámicos de plegamiento y, en general, cambios conformacionales inducidos por efectores. Las dos primeras etapas han recibido gran atención por parte de los investigadores en la pasada década. Así, por ejemplo, la asignación espectral y la determinación de la estructura tridimensional de Ribonucleasa A en disolución acuosa se han llevado a cabo este laboratorio en los últimos cinco años. Sólo en años muy recientes se han comenzado a explorar las posibilidades de la técnica de RMN en la tercera etapa. Dentro del marco, pues, del tema del plegamiento y la estabilidad de proteínas puede encuadrarse el trabajo recogido en la presente memoria dirigido principalmente a: (1) *la caracterización de factores de estabilidad y cambios conformacionales en función del pH*, y (2) *la descripción de la dinámica de fluctuaciones estructurales de Ribonucleasa A utilizando las propiedades de intercambio H/D de protones peptídicos individuales*.

El conocimiento detallado del estado de ionización de los distintos grupos ionizables presentes en un enzima es de fundamental importancia para poder conocer sus propiedades de estabilidad, dinámica plegamiento y funcionalidad. La detección de interacciones específicas que involucren a grupos cargados cuya contribución a la estabilidad puede variar con el pH (como interacciones con sustratos y catálisis) han de conocerse mejor a partir de una asignación individual de los pK_a s involucrados; por otro lado, variando el pH se altera específicamente la carga de una proteína (un polielectrolito muy especial) con consecuencias muy importantes respecto a su estabilidad y actividad biológica. En el Capítulo II de este trabajo se aborda la descripción de los factores estabilizantes y cambios conformacionales obtenidos con el pH.

Por otro lado, el comportamiento de los protones peptídicos frente al intercambio con los deuterones del disolvente fue una de las primeras claves para establecer el carácter dinámico de la estructura de las proteínas y ha permanecido desde entonces como principal contraste experimental de los diversos modelos de intercambio propuestos. En general, se acepta que, para el intercambio de los protones situados en el interior de la proteína, se requiere la existencia de algún tipo de fluctuaciones que permitan el contacto del protón con el disolvente. Mediante la espectroscopía de RMN bidimensional es posible la medida de constantes cinéticas de intercambio individuales, con lo que puede llegarse a una descripción plural y pormenorizada de la dinámica de la proteína. El factor de protección frente al intercambio, protección proporcionada por la involucración del

protón correspondiente en la estructura nativa, puede alcanzar valores de hasta diez órdenes de magnitud. Dicho factor es fiel reflejo de las diferencias en energía libre entre estados de equilibrio correspondientes a fluctuaciones conformacionales que van desde las estrictamente locales hasta el proceso cooperativo global de desnaturalización de la proteína. La cinética de intercambio de los protones peptídicos más fuertemente protegidos habrían de proporcionar, pues, energías libres asimilables a las obtenidas a partir de datos calorimétricos extrapolables a condiciones nativas. De hecho se ha propuesto que la combinación de estudios de intercambio H/D en combinación con la RMN-2D podría constituirse en el método ideal para la medida de energías libres de desnaturalización de proteínas en ausencia de efectos irreversibles, que comienzan a revelarse en las proximidades del cambio de fase. Como puede deducirse de las conclusiones de este trabajo, las cosas desgraciadamente no son tan simples y la explicación experimental de los hechos observados nos obligan a recurrir a un modelo más elaborado del estado desnaturalizado. En el Capítulo III se aborda el estudio de la dinámica de la proteína a varios pHs y temperaturas.

Capítulo I
Fundamentos

1.1. PROTEÍNAS

Las proteínas son los componentes fundamentales de la materia viva. Básicamente están compuestas de unidades más pequeñas, llamadas aminoácidos, que difieren únicamente en sus cadenas laterales. Los 20 aminoácidos que existen en las células eucariotas están basados en un mismo esquema básico: un carbono asimétrico central, unido a un grupo amino, a un grupo carboxilo y a una cadena variable, la cual marca la diferencia entre unos y otros. Esos aminoácidos pueden clasificarse por su carga eléctrica cuando están ionizados o por su afinidad por el agua (polares o no polares). El enlace peptídico que une dos diferentes aminoácidos para formar las proteínas, tiene un carácter parcial de doble enlace por lo que los átomos del grupo peptídico están dispuestos en el mismo plano, y salvo en el caso del aminoácido Prolina, donde también es posible la posición *cis* (0°), la posición que ocupan el oxígeno y el hidrógeno es la *trans* (180°). De cualquier forma los grupos peptídicos adyacentes, no son coplanares debido a la rotación alrededor de los enlaces C-C α y N-C α . La conformación de una proteína vendrá entonces caracterizada por estos dos ángulos diedros: ϕ y ψ (Creighton, 1989)

La estructura de una proteína puede describirse en cuatro niveles. La estructura primaria, que hace referencia a la disposición de los aminoácidos a lo largo de la cadena (la secuencia de la proteína). La estructura secundaria que permite el plegamiento de las cadenas en estructuras regulares como la hélice α y la lámina β (aunque existen otros tipos menos comunes de estructuras como son los llamados giros o vueltas β , que a su vez pueden clasificarse en un número reducido de tipos; Fig. I. 1). La estructura terciaria que incluye el empaquetamiento de regiones, que conectan hélices y láminas, y que concierne a la localización de estas estructuras regulares entre sí. Finalmente, la estructura cuaternaria, que se refiere a las interacciones no covalentes entre las proteínas individuales en un complejo.

1.2. LA RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTEÍNAS.

Existen núcleos, como ^1H , ^{13}C y el ^{15}N , que poseen un momento magnético o de espín. El entorno químico que rodea a tales núcleos y que será distinto para cada uno de ellos en una misma molécula, puede explorarse por medio de la Resonancia Magnética Nuclear. La mayoría de las determinaciones de la estructura tridimensional de una proteína hacen uso de las propiedades magnéticas de los protones, ^1H , dado que son los elementos más abundantes. Recientemente se están usando heteronúcleos como el ^{13}C , para obtener información sobre las constantes de acoplamiento y los ángulos de torsión,

(Hansen, 1991) y facilitar la asignación de los protones de la molécula (Clare & Gronenborn, 1991).

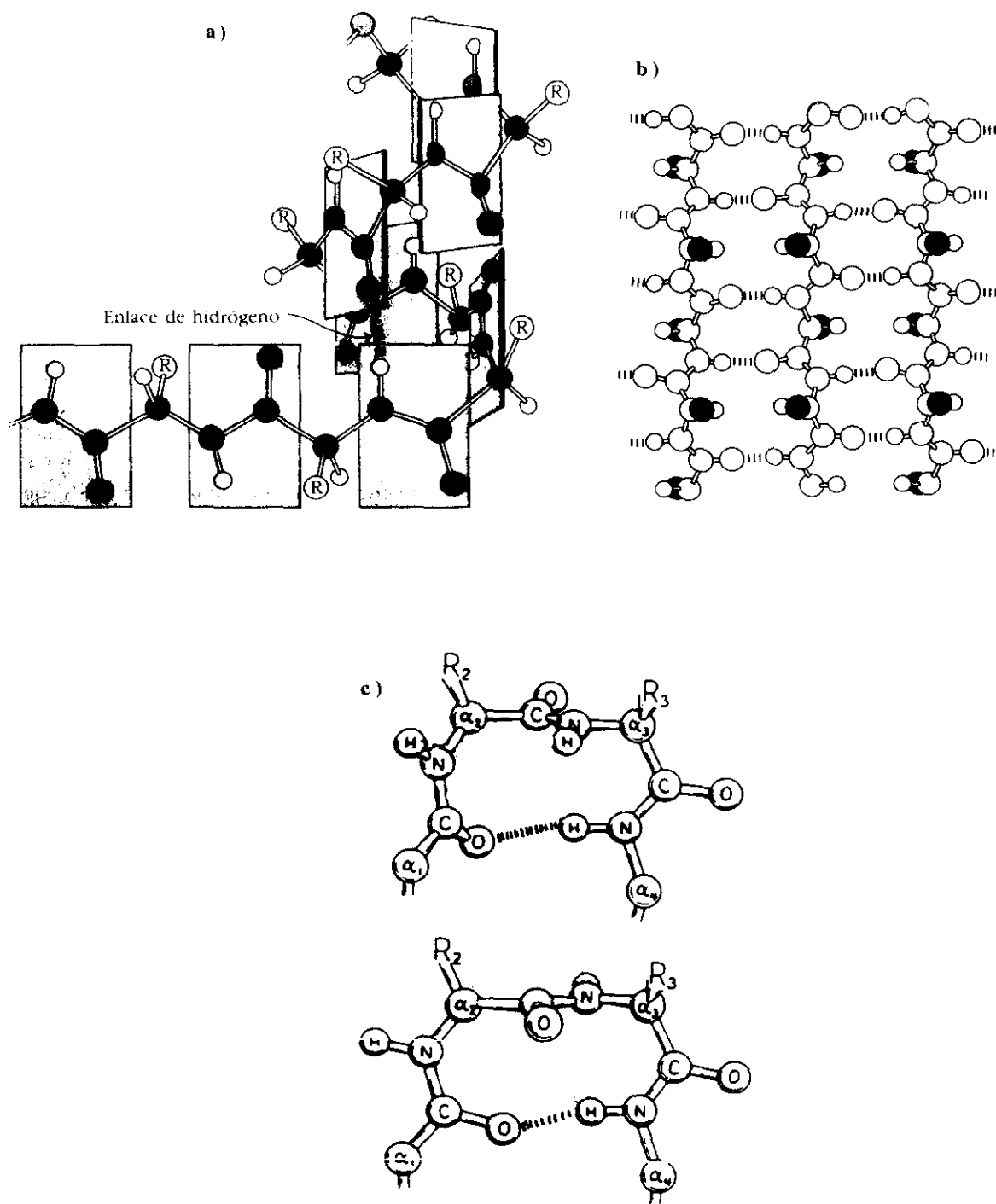


Fig. I.1: Esquema mostrando los diversos tipos de estructura secundaria existentes en las proteínas: a) hélice α ; b) lámina β y c) distintos tipos de giros.

Cuando una molécula de proteína se coloca en un campo magnético muy fuerte, el espín de sus átomos de hidrógeno tiende a alinearse con el campo. Esta situación de equilibrio puede cambiarse, excitando la muestra, y por tanto los espines, con un pulso de radiofrecuencia. Cuando los núcleos de la molécula de proteína tienden a su estado de equilibrio, emiten radiofrecuencia que entonces, puede medirse. La frecuencia exacta de la radiación de cada núcleo depende de su entorno químico particular y es diferente para cada átomo, a no ser que sean químicamente equivalentes y tengan el mismo entorno molecular. Estas frecuencias son entonces relativizadas respecto a una señal de referencia obteniéndose así desplazamientos químicos (δ). Normalmente estas perturbaciones son tan pequeñas que los desplazamientos químicos se miden en partes por millón (ppm). Por supuesto el gran potencial de la RMN radica en que la potencia, duración y combinación del número de pulsos de radiofrecuencia pueden variarse ilimitadamente, con lo que podemos explorar diferentes propiedades de las moléculas escogiendo una sucesión, una *secuencia*, adecuada de pulsos.

En principio, es posible obtener un único desplazamiento químico para cada átomo de hidrógeno en una molécula, excepto para los que son químicamente equivalentes, como los protones CH_3 de la cadena lateral de una alanina. En la práctica es imposible, que con un espectro monodimensional de RMN de una molécula de proteína, pueda asignarse a todos y cada uno de los protones una única frecuencia, debido al solapamiento de las señales y a que las diferencias en desplazamientos químicos son menores que la potencia del instrumento. En los últimos años este problema se ha resuelto con el uso de la espectroscopía bidimensional.

A pesar de que la Resonancia Magnética puede aportar información sobre la estructura primaria de la proteína, su verdadera utilidad radica en la determinación de la estructura secundaria y terciaria, así como en la caracterización de cualquier cambio local o global a nivel atómico, debido a los aspectos dinámicos de la macromolécula.

1.2.1. ESPECTROSCOPÍA BIDIMENSIONAL DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (2D-RMN).

Las técnicas de 2D-RMN fueron desarrolladas por Ernst y colaboradores en la década de los 70 (Aue et al., 1976; Ernst et al., 1987). Todas ellas siguen el mismo esquema experimental (Fig 1.2): durante el primer período, el tiempo de preparación (t_p) se permite al sistema, la proteína en este caso, que alcance el equilibrio químico, y a partir de aquí se le aplica uno (o más) pulso de radiofrecuencia con lo que se crea un estado determinado, que depende del (o los) pulsos aplicados; en este estado se deja evolucionar

al sistema durante t_1 (el tiempo de evolución). A continuación, durante el tiempo de mezcla (t_m) se consigue que las magnetizaciones inducidas se conviertan en observables. Finalmente, se detectarán estas durante el período de adquisición (t_2), en forma similar a como se hace en la espectroscopía monodimensional.

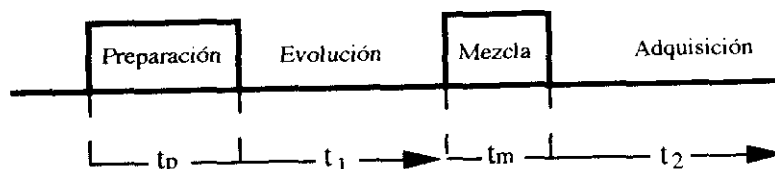


Fig. I.2: Esquema general de un experimento bidimensional.

En una serie de n experimentos el tiempo t_1 se va incrementando, de tal manera que cada experimento adquirido con el esquema de la Fig I.2 contiene información distinta a la anterior, por la diferente evolución de los espines durante ese tiempo. Los datos son acumulados en forma de matriz que, después de una transformada de Fourier respecto a t_1 (la dimensión 1) y otra respecto a t_2 (la dimensión 2), nos produce el espectro bidimensional. En este la diagonal es un análogo del espectro monodimensional y es la aparición de señales fuera de la diagonal la que identifica los espines entre los que se ha producido la transferencia de magnetización durante el tiempo de mezcla. Lo que diferenciará a unos experimentos de otros será lo que ocurre durante el tiempo de mezcla que selecciona y mejora la información contenida en el espectro. Aunque existen muchas secuencias de pulsos (y más aún actualmente, con el desarrollo de la espectroscopía tridimensional) se describirán únicamente las que se han empleado para la realización de este trabajo.

1.2.2. LOS EXPERIMENTOS BIDIMENSIONALES DE CORRELACIÓN ESCALAR.

Este tipo de experimentos permite la identificación de protones acoplados escalarmente. El primer experimento bidimensional propuesto y realizado fue un experimento de este tipo (Aue et al., 1976), publicándose desde entonces gran número de variantes. Los que se han usado son:

1.- **Experimento COSY (CORrelated SpectroscopY):** Es el más simple de todos los experimentos bidimensionales (Aue et al., 1976) y consiste en dos pulsos de

radiofrecuencia separados por el tiempo t_1 (Fig. I.3). Las señales que se encuentran fuera de la diagonal conectan espines acoplados escalarmente en un mismo residuo, pues el acoplamiento escalar entre protones se interrumpe en el grupo carbonilo del enlace peptídico. En el esquema sólo se ha señalado que la amplitud del primer pulso es de 90° , pero el segundo puede tener cualquier amplitud entre ésta y 0° .



Fig. I.3: Esquema de pulsos de un experimento tipo COSY.

2.- Experimento TOCSY (Total Correlated Spectroscopy): Es una modificación del anterior (Braunschweiler & Ernst, 1983) en la que el segundo pulso se sustituye por un tren de pulsos. La magnetización corre a lo largo de toda la red de acoplamientos y se obtiene un espectro con señales que correlacionan las frecuencias de los espines que pertenecen a un mismo aminoácido, por lo que la identificación de todos los protones de ese aminoácido es más sencilla que en el experimento anterior. En el espectro bidimensional aparece igual que en el anterior, en la diagonal una réplica del monodimensional, mientras que fuera de la diagonal, se encuentran las señales que correlacionan las dos frecuencias de dos espines que pertenecen al mismo residuo.

1.2.3. LOS EXPERIMENTOS BIDIMENSIONALES DE CORRELACIÓN DIPOLAR.

En este tipo de experimentos se obtiene información acerca de las distancias entre protones próximos en el espacio (Neuhaus & Wilianson, 1989), con lo que son los más importantes a la hora de determinar la estructura tridimensional de la proteína. Aunque las secuencias de pulsos que se manejan habitualmente son dos: **el experimento NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)** (Macura & Ernst, 1980) y **el experimento ROESY (Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy)** (Bax & Davies, 1985 b), se ha utilizado únicamente el primero, pues el segundo experimento es particularmente adecuado para moléculas pequeñas.

El esquema de pulsos del experimento NOESY aparece en la Fig I.4. Consiste de tres pulsos, de los cuales el primero crea magnetización transversal que evoluciona con una frecuencia determinada; el segundo pulso crea una población de estados fuera del equilibrio térmico, y después de dejar evolucionar el sistema, relajándose parcialmente durante el tiempo de mezcla, se consigue que la magnetización sea observable con el último pulso.

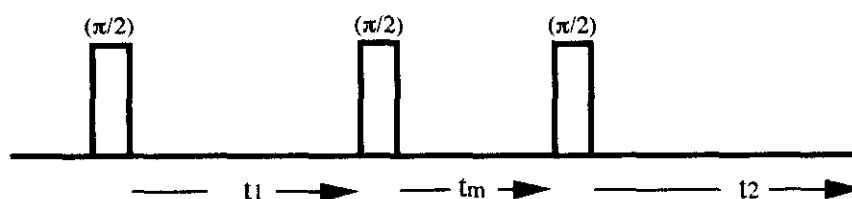


Fig. I.4: Esquema de pulsos de un experimento tipo NOESY.

1.2.4. LA ASIGNACIÓN SECUENCIAL EN PROTEÍNAS.

Obviamente, el espectro bidimensional NOESY que correlaciona dos protones de dos diferentes frecuencias es el que contiene información acerca de la estructura tridimensional de la proteína. Sin embargo, no es tarea fácil, asignar los picos observados a unos protones en particular, puesto que el orden en que aparecen los picos a lo largo de la diagonal no tiene nada que ver con la disposición de los protones en la cadena polipeptídica. El problema se resolvió en el laboratorio del profesor Wüthrich en Zürich, donde se inventó el método de **asignación secuencial** (Wüthrich, 1986); desde entonces han aparecido diversas variantes pero todas ellas se basan en los mismos principios.

La clave del procedimiento y el primer paso, se basa en el número de átomos de hidrógeno y su diferente conexión para cada uno de los diferentes tipos de aminoácidos (dicho de otra forma en su diferente cadena lateral). Cada tipo de aminoácido posee una forma especial en las conexiones entre los protones H_α y H_β de su esqueleto. Por tanto del experimento COSY es posible identificar el número de protones que pertenecen a un residuo dado, y también la naturaleza de la cadena lateral del mismo. A pesar de todo, no es posible establecer una relación biunívoca entre el esquema de acoplamientos y el tipo de aminoácido. Por lo general se agrupan en ocho tipos diferentes de modelos frente a los veinte tipos de aminoácidos que existen.

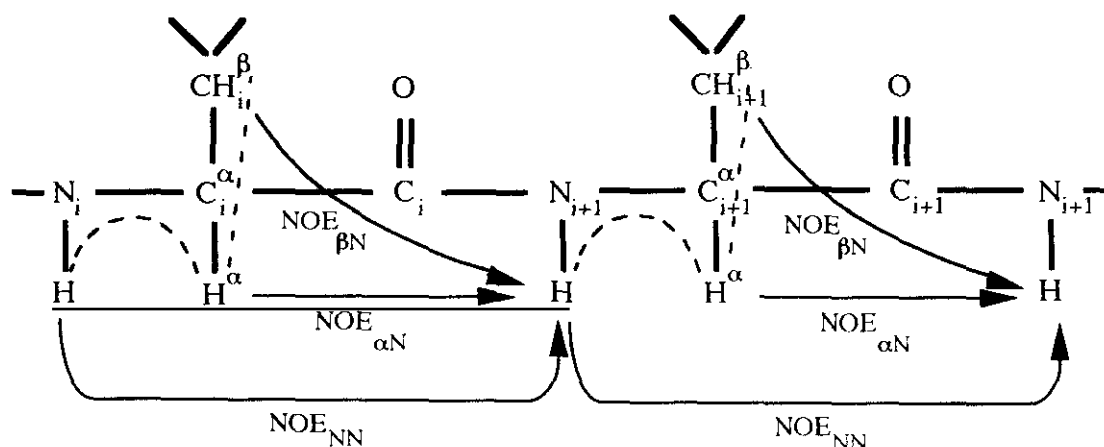


Fig. 1.5: *NOEs secuenciales (flechas) y correlaciones a través del acoplamiento escalonado (líneas de trazos) entre segmentos de protones de una cadena polipeptídica (de Blanco, 1992).*

El segundo paso consiste en la identificación de los sistemas de espín a lo largo de la cadena polipeptídica; esta información es obtenida de los experimentos NOESY, pues vendrá de aquellos protones correspondientes a residuos secuenciales. A partir de estas conexiones es posible establecer el orden secuencial de los sistemas de espín (Fig 1.5). Finalmente, comparando con la estructura primaria de la proteína, se puede asignar cada sistema de espín a un aminoácido en una posición concreta de la proteína.

En la práctica es difícil hacer asignaciones secuenciales para largos fragmentos de proteínas, pues las señales NOE también se producen entre residuos que están lejos en la secuencia de la proteína (estructura primaria) pero cerca en la estructura tridimensional de la misma; asimismo se producen degeneraciones entre las frecuencias de diferentes protones y la presencia del disolvente oculta algunas frecuencias. Para intentar solventar estos problemas lo que se hace es estudiar la proteína en diferentes condiciones de pH y temperatura.

El resultado final del procedimiento de asignación secuencial es un conjunto de restricciones de distancias, que se usa para definir regiones de estructura secundaria y establecer la estructura tridimensional de la proteína, con el uso de diversas aproximaciones computacionales (Braun, W, 1987; González, 1991).

1.3. LA RIBONUCLEASA A BOVINA.

La Ribonucleasa A bovina es uno de los enzimas mejor estudiados y conocidos, Los primeros resultados acerca de su comportamiento frente al pH, y sobre su estructura

se remontan a mediados de la década de los 50. Su comportamiento iónico frente al pH fue uno de los primeros investigados (Tandford et al., 1955; Tandford & Hauenstein, 1956), así como sus propiedades de intercambio mediante las técnicas de Linderstrøm-Lang (Hvidt & Nielsen, 1966). Hoy en día se ha convertido en una proteína modelo para multitud de estudios por métodos químicos y físicoquímicos.

La familia de Ribonucleasas ha sido secuenciada y aislada en multitud de especies animales (Beintema et al, 1988) observándose en todas ellas una gran homología de secuencia. La mayor parte de los estudios se han realizado con la ribonucleasa de páncreas bovino por encontrarse allí en enormes cantidades. Actualmente se puede disponer de ella comercialmente, con pequeñas concentraciones de fosfato (tipo Sigma) o libre de él (tipo Worthington).

La Ribonucleasa A de páncreas bovino es una proteína de 14 Kdalton de masa molecular; consta de 124 aminoácidos y posee 4 puentes disulfuro en las posiciones: 26-84, 40-95, 58-110 y 65-72. Su forma es arrañonada, con una depresión justo en uno de sus lados que constituye el centro activo del enzima (Fig I.6).

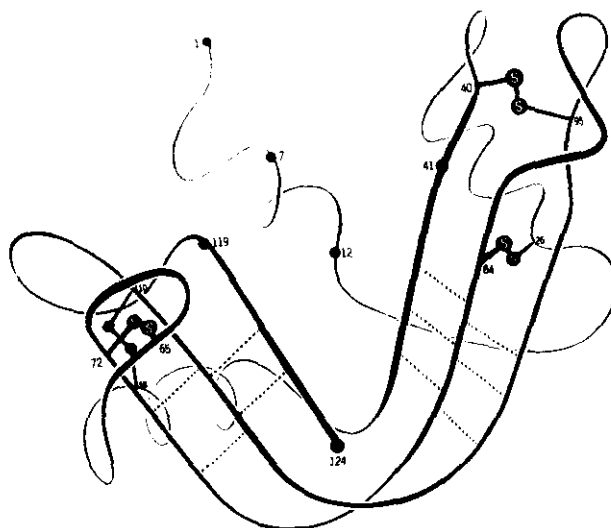


Fig I. 6: *Estructura terciaria de Ribonucleasa A bovina.*

La función biológica de este enzima es hidrolizar ácido ribonucleico (Richards & Wyckoff, 1971). Esta reacción transcurre en dos pasos: en el primero se forma un nucleótido 2',3'cíclico (esto es una transesterificación); en el segundo paso este intermedio es hidrolizado lentamente para dar un nucleótido 3'. La reacción se produce específicamente.

De la multitud de estudios realizados con el enzima (ver Richards & Wyckoff, 1971, para una descripción completa), a continuación se describirán únicamente aquellos que tengan alguna relación con los resultados y las discusiones expuestas en este trabajo.

1.3.1. ESTRUCTURA DEL ENZIMA.

La Ribonucleasa A ha sido estudiada en detalle, mediante las técnicas de difracción de Rayos X, obteniéndose estructuras altamente refinadas (Borkakotti et al., 1982). También se han empleado las técnicas de difracción de neutrones que han dado información de la movilidad de las cadenas laterales y de las fluctuaciones internas (Wlodaver & Sjölin, 1983). Como primer resultado de estos estudios se han identificado los elementos de estructura secundaria del enzima. Contiene tres α hélices situadas entre los residuos 3 al 13, 24 al 34 y 50 al 60. Estas regiones no son completamente regulares, pues tanto en la segunda como en la tercera existen regiones con configuración 3_{10} . Existen dos zonas de lámina β : la primera está compuesta por tres hebras en configuración antiparalela (residuos 42-48, 79-87 y 96-104) y la segunda está formada por cuatro filamentos (residuos 61-64, 71-74, 105-111 y 117-124). Asimismo se han realizado estudios cristalográficos con el enzima unido a diferentes sustratos, que han permitido caracterizar todos los residuos implicados en el centro activo: His 12, Lys 41, Val 43, Asn 44, Thr 45, His 119, Phe 120, Asp 121 y Ser 123. Actualmente se están investigando las diferentes movilidades de cada una de las cadenas laterales y el grado de desorden de las mismas (Svensson et al., 1986).

Sin embargo, por las razones expuestas anteriormente, convendría saber si su estructura en disolución coincide con la estructura cristalina, para lo cual era necesaria la asignación del espectro protónico de Ribonucleasa A. Paralelamente al estudio de sus propiedades biológicas y físico-químicas, el enzima fue uno de los primeros estudiados por la técnica de RMN monodimensional (Schechter et al., 1972; Jardetzky & Roberts, 1981), que permitía información acerca del entorno que rodeaba a algunos residuos aromáticos. No obstante, si se quería obtener una estructura completa en solución era necesario hacer una asignación por las técnicas de RMN bidimensionales, dado el gran número de aminoácidos que componían la cadena. El primer intento se llevó a cabo por Rüterjans (Hahn & Rüterjans, 1985) que asignaron 21 residuos de los 33 sistemas de espín que identificaron. El siguiente intento, no se produjo hasta 1988, donde se usaban las técnicas NOESY y TOCSY (Lian, 1988). La asignación completa llegó de la mano de dos grupos que trabajaban paralelamente (Rico et al., 1989; Robertson et al., 1989).

Una vez asignado el espectro, podía obtenerse la estructura en disolución del enzima, con un alto grado de fiabilidad (Rico et al., 1991; Rico et al., 1993). Los resultados concuerdan muy bien con las estructuras obtenidas en estado cristalino, (Fig. I.7) observándose en esencia los mismos elementos de estructura secundaria (Santoro et al., 1993), aunque existen algunas diferencias en los puentes de hidrógeno encontrados. El empleo de otro de los parámetros que se pueden extraer de las técnicas de RMN: la medida de las constantes de acoplamiento, ha permitido la determinación de las accesibilidades y, por tanto el movimiento de las cadenas laterales (Fig I.8) Es esta estructura en disolución altamente refinada, la que ha servido para muchas de las discusiones expuestas en este trabajo.

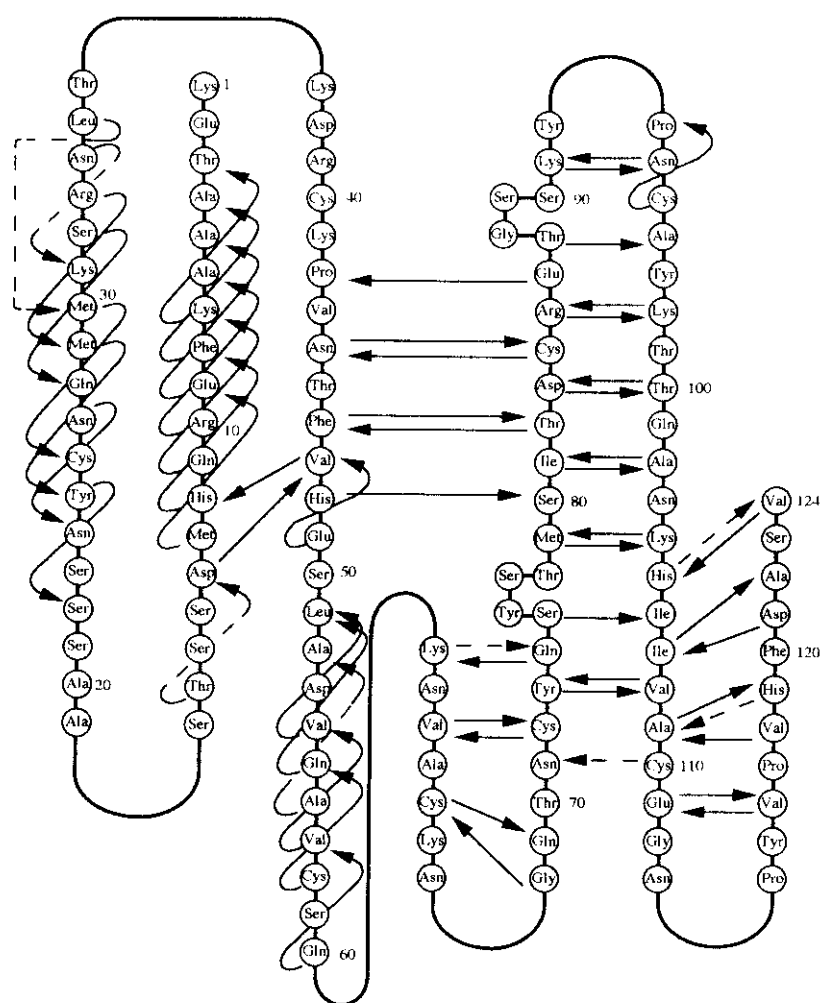


Fig I. 7: Esquema mostrando los elementos de estructura secundaria y los puentes de hidrógeno entre los protones del esqueleto para la Ribonucleasa A.

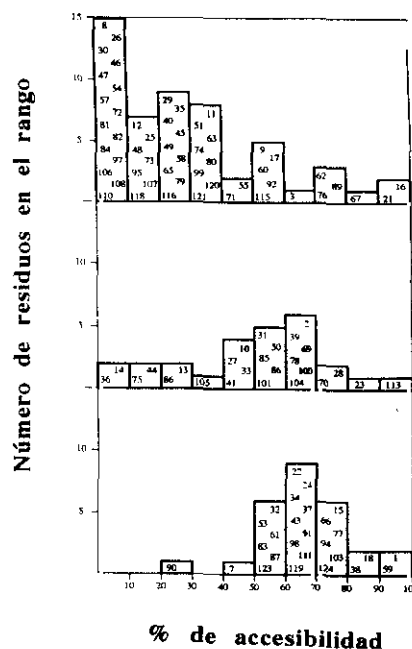


Fig 1. 8: Accesibilidades de cada uno de los residuos que componen la Ribonucleasa A (de Santoro et al., 1993).

1.3.2. PLEGAMIENTO DEL ENZIMA.

Poco después de probarse que la proteínas podían adquirir su conformación nativa espontáneamente sin una "ayuda" externa, gracias a los estudios de Anfinsen sobre Ribonucleasa A, se señaló que si este proceso (Levinthal, 1968) ocurría de una forma aleatoria, la proteína podría tardar años en adquirir su conformación dado que el número de diferentes conformaciones era muy elevado, cuando lo que se observaba es que la reacción de plegamiento transcurría en unos segundos. Claramente la secuencia de aminoácidos contiene la suficiente información para "guiar" su plegamiento.

Los primeros estudios sobre el plegamiento de la proteína fueron realizados por Anfinsen y colaboradores (Anfinsen et al., 1961) poniendo especial cuidado en la importancia de los puentes disulfuro para la estabilidad y el plegamiento de la misma. Reduciendo la proteína, en condiciones desnaturalizantes, y volviéndola a oxidar, se observó que la moléculas producidas eran totalmente iguales a la proteína nativa, que es su estado más estable, y lo que era más importante, que la proteína contiene en su secuencia toda la información que precisa para plegarse correctamente a su estructura nativa.

Desde entonces se han llevado a cabo muchos experimentos con muy diferentes técnicas para intentar dilucidar el mecanismo de plegamiento. Como la proteína posee puentes disulfuro una buena aproximación consistía en aislar posibles intermedios durante la renaturalización a partir de condiciones desnaturalizantes, en las que la proteína

no tenía ningún puente disulfuro; de estos resultados se obtuvo la conclusión (Scheraga et al., 1987) de que la proteína seguía un mecanismo formado por varios caminos de plegamiento con diferentes procesos limitantes para cada uno. Estos procesos, que actuaban como cuello de botella de la reacción implicaban la ruptura de puentes disulfuro, formación o reagrupamiento de los que ya existían. Un estudio más cuidadoso de los resultados (Wearne & Creighton, 1988) mostró, por el contrario, que la proteína seguía un camino en el que el paso limitante ocurría únicamente en aquellas especies que poseían tres puentes disulfuro formados, y separaba las especies totalmente plegadas de otros intermedios con uno o dos puentes disulfuro.

Paralelamente, mediante técnicas basadas en la hidrólisis con varias enzimas durante el proceso de renaturalización (Schmid & Blaschek, 1984; Lang & Schmid, 1986) mostraron que el plegamiento era un proceso secuencial que implica intermedios bien poblados. Se habían detectado dos intermedios: uno muy tardío el cual posee una estructura semejante a la de la proteína nativa, y otro que se forma muy pronto en las primeras etapas del plegamiento, y el cual posee una estructura secundaria muy parecida a la de la nativa. Los resultados mostraban que, en primer lugar, el extremo C-terminal se protegía muy pronto, y en segundo lugar, el fragmento 31-39 de la cadena polipeptídica, que forma un giro en la estructura, es accesible durante las primeras etapas, y no se pliega hasta las últimas. Por el mismo grupo de trabajo (Schmid et al., 1986) se estableció el papel que desempeñaba la Prolina 93, que se halla en *cis* en la estructura nativa, encontrándose que las especies que contienen el isómero incorrecto (el isómero *trans*) son las que forman fundamentalmente la población de las moléculas más lentas. Esta isomerización de la forma *trans* (no nativa) a la *cis* (nativa) era acelerada por la presencia de intermediarios de plegamiento (Schmid, 1986). Estudios comparativos entre diferentes Ribonucleasas pancreáticas (Lang et al., 1986) concluyeron que el otro enlace *cis* que existía en muchas de ellas (Pro 114-Tyr 115) era también fundamental para la proporción de la población de aquellas moléculas que se renaturalizaban lentamente.

Ya se ha descrito un método para atrapar intermediarios (Wearne & Creighton, 1988), sin embargo se puede hacer uso de los hidrógenos lábiles de una proteína, que se encuentran distribuidos a lo largo de toda la estructura para detectar el modelo de puentes de hidrógeno que muestran esas especies durante el replegamiento e intentar la caracterización de su estructura secundaria. Con las técnicas de pulsos y el complemento de las técnicas ópticas (Brems & Baldwin, 1985; Englander & Mayne, 1992) fue posible la caracterización inequívoca de tres especies diferentemente pobladas durante el plegamiento que incluyen una fase rápida y una lenta; ambas fases se renaturalizan siguiendo un mecanismo cinético de dos estados. Otra componente, la mayoritaria, posee

una estructura cinética más compleja, presentando un intermedio con puentes de hidrógeno y estructura como la nativa.

Recientemente, con el empleo de las técnicas de pulsos en conjunción con la RMN bidimensional (Udgaonkar & Baldwin, 1988; Udgaonkar & Baldwin, 1990), se ha comprobado la heterogeneidad de la población durante la renaturalización de la Ribonucleasa, y la presencia de un intermediario parcialmente plegado (de considerable estabilidad) con la lámina β parcialmente formada y también con las hélices segunda y tercera prácticamente intactas; la primera hélice se forma más tarde.

Capítulo II

**Equilibrios de ionización:
estabilidad y cambios con el pH**

2.1. INTRODUCCIÓN.

2.1.1 LOS EQUILIBRIOS DE IONIZACIÓN EN PROTEÍNAS.

Las interacciones electrostáticas son muy importantes para la química de las proteínas (Perutz, 1978). Los campos eléctricos se acoplan directamente a la estructura electrónica y por tanto pueden ser de gran importancia para la química de la catálisis. Más aún, el hecho de que las interacciones electrostáticas sean de largo alcance, muestra que son muy importantes para la estructura, la estabilidad y la solvatación de las macromoléculas (Matthew & Richards, 1982; Bashford, 1991). A causa de este importante papel, la posibilidad de asignar a cada residuo particular una constante de ionización (o lo que es lo mismo un pK_a determinado) puede ayudar en el desarrollo del comportamiento de la catálisis, las interacciones proteína-proteína, intercambio con el disolvente y otros fenómenos, y por tanto ayudar en el desarrollo de especies proteicas diseñadas genéticamente más eficaces.

Entre los estudios más antiguos de proteínas con el uso de la RMN monodimensional, los experimentos de titulación, observando los protones aromáticos, condujo a interesantes resultados (Jardetzky & Roberts, 1981). Sin embargo, debido al solapamiento pronto dejó de ser útil, si se querían observar protones más concretos. Con el uso de la espectroscopía bidimensional este problema se soluciona, es más, los espectros pueden proporcionarnos detalles de los cambios conformacionales que suceden mientras cambia el pH e información electrostática sobre todos y cada uno de los protones de una proteína; el inconveniente radica, por supuesto, en las grandes cantidades de tiempo para adquirir los experimentos y para estudiarlos. El método aplicado es muy sencillo, consiste en observar los cambios de δ con el pH, e intentar describir en su forma más sencilla este comportamiento como un equilibrio ácido-base entre dos estados: la forma protonada y desprotonada, que sigue la ecuación de Henderson-Hasselbach:

$$\frac{[AH]}{[A]} = \frac{[H^+]}{K_a} \quad \{1\}$$

Si consideramos que la cooperatividad de la transición entre los estados protonado y desprotonado viene dada por un factor n , definido (Hill, 1910; Markley, 1973):

$$\left(\frac{[AH]}{[A]} \right)^n = \frac{[H^+]}{K_a} \quad \{2\}$$

donde se han representado por AH y A la especie protonada (ácida) y desprotonada (básica), respectivamente. Si $n = 1$ el ácido se comporta normalmente, si $n < 1$ o $n > 1$ son casos de comportamiento cooperativo y anticooperativo, respectivamente. Otros

autores definen el parámetro de Hill como el inverso del que nosotros hemos definido arriba (Saito et al., 1991); hemos preferido la expresión superior por la facilidad a la hora de introducirla en la ecuación de Henderson-Hasselbalch .

Para entender mejor el concepto del coeficiente de cooperatividad (coeficiente de Hill) hay que considerar la interacción entre sí de las cadenas laterales de los aminoácidos en las proteínas. En estas, los residuos individuales pierden las propiedades del *zwitterion* (Lehninger, 1985) al formar los enlaces peptídicos. Por tanto sólo debemos centrarnos en los dos extremos terminales y en las cadenas laterales de los posibles aminoácidos. Dos efectos motivarán que estas titulen de diferente forma a como lo hacen en los aminoácidos individuales (Cantor & Schimmel, 1980):

a) Interacciones electrostáticas causadas como consecuencia de las estructuras primaria, secundaria y terciaria en el entorno químico local.

b) Interacciones termodinámicas causadas por el acoplamiento entre la ionización y el equilibrio conformacional de la proteína.

De esta forma, los desplazamientos experimentados por los pK_a s serán una expresión de la fuerza de la interacción que existe entre diferentes grupos electrostáticos, o entre las diferentes capas de hidratación de los residuos hidrofóbicos y polares cuando están suficientemente cercanos (Urry, 1992). Estas interacciones son las que aparecen medidas por la expresión del índice de Hill: valores que se separan de la unidad mostrarán una interacción considerable entre dos grupos cercanos ya sea de una forma cooperativa (esto es, la ionización o protonación de uno se verá favorecida por la presencia cercana de otro) o anticooperativa (Wyman & Gill, 1990).

A pesar de ello la medida de la interacción con el índice de Hill, no resulta fácil matemáticamente, por lo que resulta útil intentar hallar otra forma más tangible que nos proporcione una medida de esa interacción; la solución es relacionar esta diferencia de pK_a (entre el medido y el intrínseco) con la energía de repulsión (Cantor & Schimmel, 1982; Urry et al., 1992):

$$\Delta G = 2.303 R T \left(pK_a' - pK_a \right) \quad \{3\}$$

donde ΔG es la energía libre que muestra esa interacción electrostática, y pK_a' es el pK_a aparente medido, mientras que pK_a es el intrínseco, el que presentaría si no existiera ninguna interacción (el factor 2.303 resulta como consecuencia de la conversión de logaritmos decimales a neperianos). El problema con esta aproximación es que en la mayoría de los casos si la titulación se aleja considerablemente de la unidad, no es posible

determinar con mucha precisión el valor de pK_a' , con el consecuente error en la medida de la energía de interacción, mientras que con el índice de Hill, tenemos la seguridad, al menos a nivel cualitativo de lo cerca o lejos que se encuentran cada uno de los diferentes pK_a s aparentes que sienten los protones.

El acoplamiento termodinámico de las constantes de ionización y el equilibrio de plegamiento, dado en la expresión {3}, sugiere una regla muy simple para evaluar los efectos de los grupos ionizables sobre la estabilidad de la proteína. Verdaderamente un detallado análisis de los valores de los pK_a s aparentes de los residuos de la proteína provee una fuente inagotable para estudiar las fuerzas electrostáticas que estabilizan el estado plegado dado que estos valores sondan directamente la contribución electrostática de cada grupo a la estabilidad total de la proteína. Dicho de otra forma si un pK_a obtenido es menor que el correspondiente al que posee en el estado desnaturalizado (es decir, el intrínseco) la base conjugada estabiliza la estructura plegada. Inversamente, si el pK_a de un grupo en la estructura es mayor que el intrínseco el ácido conjugado estabiliza la forma plegada respecto a la desnaturalizada.

Una vez consideradas las estructuras secundarias y primarias, y la interacción, por tanto con las cargas de la propia proteína, hay que considerar las interacciones con todas las restantes cargas presentes, con lo que tenemos el problema del disolvente; todo polielectrólito, y por tanto una proteína, tiende a atraer o repeler una atmósfera iónica, lo cual tiende a debilitar las interacciones iónicas en cualquier dirección. Por supuesto, la densidad de esta atmósfera iónica dependerá de la concentración iónica en disolución, así como de la accesibilidad (y por tanto de la geometría) de los grupos iónicos que son capaces de titular. En principio, las medidas que se lleven a cabo a una fuerza iónica muy grande reflejarán sólo las interacciones entre los grupos muy cercanos en el espacio. Con todo ello, los complejos efectos que resultan de todas las interacciones electrostáticas, han hecho imposible el establecimiento de un modelo adecuado para describir el comportamiento de una proteína (Delapierre et al., 1987).

Para interpretar los datos de titulación, hay que reseñar previamente la relación entre el desplazamiento químico y el comportamiento electrostático (Forman-Kay et al., 1992). El análisis de los pK_a s se basa en el estudio macroscópico del sistema, dado que en una determinada acidez el sistema está protonado o desprotonado. El δ observado para una señal, será el promedio de todas las frecuencias de las especies que estén en equilibrio rápidamente. Por supuesto, esta resonancia para una de esas especies individualmente es el resultado de un apantallamiento electrónico y de la electronegatividad de una carga parcial que sea capaz de polarizar los electrones que estamos observando en el experimento de RMN. Los cambios en el desplazamiento químico los causará el hecho de que

se favorece el equilibrio de una especie frente a otra, y este cambio que se necesita para acomodar un protón o la pérdida del mismo puede ser pequeño o en ocasiones bastante considerable (Khoda et al., 1991; Abilgaard et al., 1992). En resumen, el cambio en el desplazamiento químico puede atribuirse a un cambio en la densidad de carga de un grupo ionizable, o a un cambio conformacional acompañado del cambio en el potencial eléctrico; la extensión en que se produzca cada uno de esos fenómenos dependerá de la posición del residuo en particular.

El presente estudio está encaminado a describir en primer lugar, como varía la estabilidad de una proteína con el pH, estudiando cualquier posible cambio conformacional en la misma, y en segundo lugar, proporcionarnos las claves para una comprensión del comportamiento global electrostático de la proteína.

2.1.2 ANTECEDENTES EN LAS DETERMINACIONES DE LOS EQUILIBRIOS DE IONIZACION EN RIBONUCLEASA A.

Hasta la llegada de la técnica de RMN, las únicas formas de estudiar los equilibrios de ionización en las proteínas eran mediante la titulación electrométrica, las técnicas espectrofotométricas (muy adecuadas para los grupos fenólicos, al cambiar radicalmente sus propiedades de absorción al desprenderse del protón fenólico) y mediante técnicas infrarrojas (cuando el disolvente usado era D₂O) (Tandford, 1962).

Los primeros estudios de Ribonucleasa fueron espectrofotométricos observándose que el comportamiento de tres tirosinas era muy diferente al de las otras tres, es decir tres de ellas titulaban con un pK_a aparente de 9.9, mientras que las demás lo hacían alrededor de pH = 13.0 (Tandford et al, 1955; Fig.II.1). Esto llevó a concluir que tres de ellas se encontraban muy accesibles al disolvente y otras tres muy enterradas en la estructura (Tandford, 1962). Los mismos resultados se obtuvieron en las titulaciones electrométricas (Fig II.2; Tandford & Hauenstein, 1956), concluyéndose por otro lado que no debían producirse grandes cambios conformacionales entre pH 1.8 y 11.5 Sin embargo aquí, ya se observaron anomalías a pHs muy ácidos, indicando que podía existir un grupo rodeado de un entorno muy electropositivo el cual presentaba un pK_a aparente más bajo de lo esperado. El mismo resultado se obtuvo por medidas de transferencia (Hermans & Scheraga, 1961), precisándose que su pK_a < 2.0.

Con la llegada de las técnicas de RMN y el conocimiento de la estructura de la enzima, se pudieron realizar estudios de todos los protones aromáticos (Lenstra et al.,

1979), concluyéndose que los protones predichos que se encontraban muy enterrados en la estructura y que no titulaban en condiciones normales de pH eran la Tyr 25 (implicada en la segunda hélice, y que introduce su anillo aromático entre las hebras de la primera lámina), la Tyr 97 (que forma parte de un giro β) y la Tyr 73, que se encuentra en la segunda lámina; asimismo se observó, aunque no se explicó, la existencia de un comportamiento anómalo (al desaparecer las señales de sus protones aromáticos en la zona de titulación) para uno de los anillos de Histidina implicado también en la estructura de la primera lámina. Las observaciones fueron más sorprendentes cuando se comprobó que un derivado enzimático de Ribonucleasa A (la Ribonucleasa S) no mostraba este comportamiento anómalo (Cohen et al., 1973).

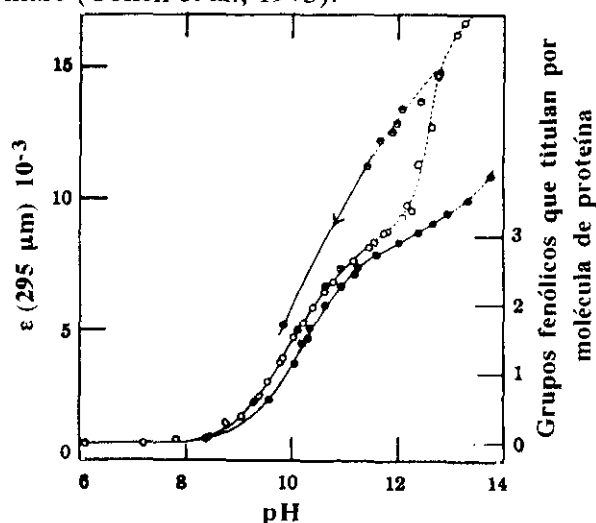


Fig II.1: Disociación de los grupos fenólicos de Ribonucleasa A con fuerza iónica de 0.15 (de Tandford et al., 1955).

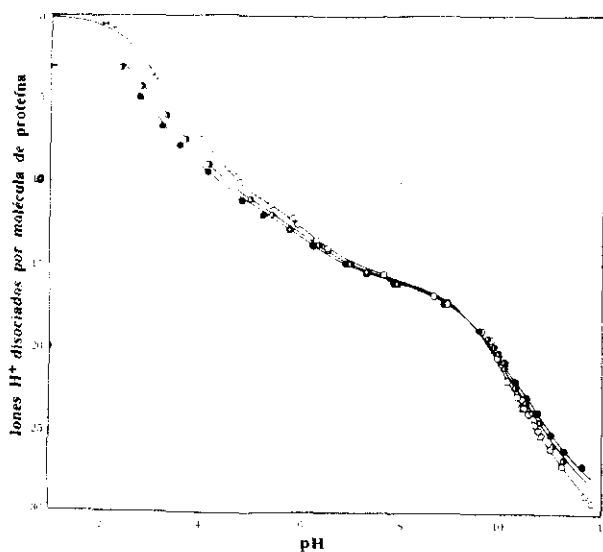


Fig II.2: Titulación electrométrica de Ribonucleasa A con diferentes fuerzas iónicas a 298 K (de Tandford & Hauenstein, 1956).

Recientemente han aparecido estudios de la estabilidad de la proteína con el pH, atribuyendo su baja estabilidad a bajo pH, como consecuencia del enorme conjunto de carga positiva que posee la proteína a esas condiciones (Pace et al., 1990)

2.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

2.2.1.PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE RMN.

La proteína fue adquirida de Sigma (con fosfato) o de Worthington (libre de fosfato) y usada sin ninguna purificación posterior. Las muestras eran preparadas disolviendo 25 mg de proteína en 0.5 ml de H₂O (con 10 % de D₂O) y se ajustaba el pH con NaOH o HCl. Ninguna de las muestras estudiadas se realizó con medio tamponado. Los pHs fueron medidos en un electrodo de vidrio Ingold, calibrado frente a tampones acuosos ordinarios. Las soluciones tenían una concentración de 0.2 M de NaCl (6 mg en 0.5 ml) y una vez preparadas son llevadas a tubos de RMN de 5 mm de diámetro (Norell). Se midió el pH de las muestras antes y después del experimento, observándose en algunos de ellos cierta variación de 0.1 unidades de pH. En cualquier caso los desplazamientos químicos medidos se han representado frente a la última lectura realizada después del experimento.

Los pHs fueron 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.2, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.2 y 8.5. Aunque no todos los protones podían ser vistos a todos los pHs, debido tanto a cuestiones de intercambio a altos pHs como al hecho de su propia titulación (señales anchas o incidencia del protón observado con la señal del agua), las curvas de titulación de prácticamente la mayoría de ellos pudieron seguirse sin ninguna dificultad.

2.2.2.ESPECTROSCOPÍA DE RMN.

Las medidas se llevaron a cabo en dos diferentes instrumentos:

1.- Espectrómetro *Bruker WM-360*, operando a una frecuencia de 360 MHz para el protón, controlado por un computador *Aspect 3000* con el programa DISNMR de Bruker.

2.- Espectrómetro *Bruker AMX-600* con una frecuencia de 600 MHz (14 Teslas), equipado con un ordenador *Aspect X32*, usando el programa UXNMR de Bruker.

En ambos espectrómetros el control de la temperatura se consiguió mediante el acoplamiento de una unidad *Haake* de enfriamiento del aire. La regulación de temperatura se realiza con la unidad *BVT 2000* Eurotherm de Bruker. La precisión era de $\pm 0.1^\circ \text{C}$.

Se realizaron experimentos de tipo TOCSY (Braunschweiler & Ernst, 1983) con 16 barridos de 2048 palabras (2K palabras, donde cada palabra equivale a 4 bytes) cada uno en la dimensión F2 y 256 incrementos en la dimensión F1. Esto le confiere un tamaño de 2048×256 . La anchura espectral fue de 8000 Hz en ambas dimensiones. La duración de cada experimento es de 1 h 35 min. La eliminación del agua se mejoró mediante presaturación selectiva durante el tiempo (1 s) de relajación de los espines (Hore, 1989). El tiempo de mezcla empleado fue de 60 ms. La magnetización transversal se indujo mediante la secuencia MLEV-17 (Bax & Davies, 1985 a) Antes de comenzar el experimento, y dado que la secuencia MLEV 17 calienta mucho la muestra, se dejó un tiempo en el que se realizaron 300 barridos pero sin adquisición, con lo que llegado el momento de efectuar ésta, la muestra ya ha alcanzado la temperatura adecuada.

Con el instrumento operando a la frecuencia de 360 MHz, no era posible usar la secuencia de tipo TOCSY, con lo que la variación de los desplazamientos químicos se siguió con un experimento tipo COSY sensible a la fase (Aue et al., 1983), con 2048 palabras en la dimensión F2 y 512 experimentos en la dimensión F1. La anchura espectral fue de 4000 Hz en ambas dimensiones. La eliminación del agua también se realizó mediante la presaturación. En estas condiciones la adquisición se prolongaba durante 12 horas.

A fin de conseguir un mejor resultado en la asignación de aquellos aminoácidos con largas cadenas laterales, que no hubieran podido ser observadas en el experimento TOCSY, se realizaron experimentos NOESY (Jenner et al., 1979; Kumar et al., 1980), con tiempos de mezcla de 150 ms. La anchura espectral fue de 4000 Hz, con el instrumento de 360 MHz y de 8000 Hz, con el de 600 MHz. Los espectros se adquirieron con 2048 puntos en la dimensión F2 y 256 en la dimensión F1. Con el espectrómetro de más alto campo los experimentos duraban 15 horas, mientras que con el de 360 MHz la duración aproximada era de 22 horas.

En algunos experimentos NOESY muy especiales, no se eliminó el agua mediante presaturación, sino lo que se hizo fue no excitarla, mediante la secuencia p11 (Plateau & Guéron, 1982; Hore, 1984) incorporada al final de la secuencia del NOESY. Por el contrario, en otros se usaron las recientes técnicas de excitación selectiva (Bauer et al., 1984; Kessler et al., 1986) con las que en la dimensión F2 sólo se excitaba la región de los NH, evitando con ello todos los problemas de fase que lleva consigo el empleo de la secuencia p11 y mejorando la resolución, puesto que la anchura espectral es menor.

En todos los experimentos se empleó en ambas dimensiones el método de TPPI (Time Proportional Phase Increment) (Bodenhausen et al., 1980; Marion & Wüthrich, 1983)

En el instrumento de alto campo, los experimentos antes de ser procesados se rellenaron de ceros en la dimensión F1 hasta 1024 palabras. Los experimentos NOESY fueron procesados, en todas las variantes descritas, con las ventanas sen^2 en ambas dimensiones y desplazamientos de $\pi/4$ en F2 y $\pi/6$ en F1. Posteriormente se corrigieron en línea base con un polinomio de grado 3, donde fue posible; en los experimentos que usaban la secuencia p11, la corrección de línea base sólo se realizó en una región del espectro (aquella cuya fase estaba bien ajustada). Los experimentos TOCSY, fueron procesados con las mismas ventanas y desplazamientos y la corrección de la línea base fue idéntica. En los experimentos COSY, en cambio, se usaron las ventanas seno en ambas dimensiones sin ningún desplazamiento; la corrección de línea base no fue posible aplicarla con el instrumento de más bajo campo.

En todos ellos, las señales fueron calibradas con respecto a la de la sal sódica del TSP.

2.2.3. CÁLCULO DE LOS VALORES DE LOS pK_a .

El enorme número de las curvas de titulación de los desplazamientos químicos con el pH, se ajustaron a un simple modelo derivado de la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{\text{base conjugada}}{\text{ácido conjugado}}\right) = pK_a + \log\left(\frac{\Theta}{1 - \Theta}\right)$$

donde Θ es el grado de disociación del ácido conjugado. Si consideramos que hay un rápido equilibrio entre la forma protonada (ácido conjugado) y la desprotonada (base conjugada), el δ observado será un promedio de ambas, con lo que

$$\delta = \delta_{\text{base}} \times \Theta + \delta_{\text{ácido}} \times (1 - \Theta)$$

donde δ_{base} y $\delta_{\text{ácido}}$ representan los desplazamientos químicos a altos y bajos valores de pH, respectivamente. El valor $\Delta\delta$, que usaremos repetidamente a lo largo de nuestros resultados se define como:

$$\Delta\delta = \delta_{\text{ácido}} - \delta_{\text{base}}$$

De arriba se obtiene:

$$\Theta = \frac{(\delta - \delta_{\text{ácido}})}{(\delta_{\text{base}} - \delta_{\text{ácido}})}$$

Sustituyendo esta en la ecuación de Henderson-Hasselbach alcanzamos

$$\delta = \frac{(\delta_{\text{ácido}} + \delta_{\text{base}} \times 10^{(\text{pH} - \text{pK}_a)})}{(1 + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_a)})}$$

que ya puede ser usada para el cálculo de los parámetros de interés: pK_a , δ_{base} y $\delta_{\text{ácido}}$. Si tenemos en cuenta la cooperatividad de la transición entre los dos estados, la ecuación de Henderson-Hasselbalch queda:

$$\delta = \frac{(\delta_{\text{ácido}} + \delta_{\text{base}} \times 10^{\frac{(\text{pH} - \text{pK}_a)}{n}})}{(1 + 10^{\frac{(\text{pH} - \text{pK}_a)}{n}})}$$

Y ya no hay más que ajustarla tomando como parámetros a determinar n , pK_a , δ_{base} y $\delta_{\text{ácido}}$. En el caso de comportamientos complejos donde en las curvas de titulación podían influir más de un pK_a , se prefirió el ajuste a un solo valor, debido a la confluencia de varios posibles valores de titulación, además en muchos casos no se iba a mejorar sustancialmente el resultado (Forman-Kay et al., 1992). Cuando en algunas curvas se observaban dos o más posibles titulaciones determinables, se descompuso el conjunto de datos, y se ajustó cada uno de ellos separadamente.

Se usó el procedimiento de mínimos cuadrados (Kaleidagraph, Adelbeck Software) para determinar los parámetros citados. Como dicho programa necesita la introducción previa de unos valores aproximados de los parámetros a determinar, estos fueron introducidos a partir de la inspección visual de las curvas, por ello se partió siempre de un valor de $n = 1$, ante la carencia de cualquier tipo de información a priori de la curva. Fue necesario ajustar, en algunos casos, adecuadamente estos valores de partida, pues con valores muy alejados el proceso no convergía adecuadamente o producía resultados erróneos. Todas las curvas presentadas en este trabajo poseen un coeficiente de regresión, como mínimo del 0.86.

La constante de ionización aparente, pK_a , de los grupos ionizables, se determinó como el promedio de los pK_a s que "sentían" los protones cercanos al grupo que se ioniza. Aquellas resonancias que mostraban una desviación estándar menor o igual que 0.2, se consideró que estaban afectadas por la desprotonación del grupo ionizable que

tenía el valor de pK_a más próximo (valorándose en algunos casos la influencia del valor que presentaba n). Debido al error inherente a la medida de los δ , de 0.02 ppm, aquellas resonancias que tenían un cambio en el desplazamiento químico pequeño (menor o igual que 0.05 ppm), y por tanto posibles pK_a s determinados con una desviación estándar muy elevada, se han considerado independientes con el pH (Kohda et al., 1991; Forman-Kay et al., 1992).

2.3. RESULTADOS.

Se han determinado las curvas de titulación de los, aproximadamente, 700 protones con diferentes desplazamientos químicos que posee la Ribonucleasa A; de ellos 305 presentan un pK_a que es observable y medible.

En general se ha observado que los protones peptídicos son más sensibles a cualquier variación de carga en su entorno próximo por lo que resultan más adecuados para la determinación de los pK_a s de grupos próximos cargados que titulen (Forman-Kay et al., 1992). Esto se debe al hecho de que el enlace N-H es mucho más fácil de polarizar que el enlace C-H. La parte negativa de esta extraordinaria sensibilidad es que, debido a la baja constante dieléctrica que existe en el interior de la proteína, cambios en las cargas parciales pueden afectar las resonancias de protones muy alejados.

Como era de esperar (Tandford, 1962; Dempsey, 1986) aquellos residuos que se encuentren en un entorno más hidrofóbico son ácidos mucho más estables que los que estén rodeados de moléculas de disolvente.

El hecho de realizar el estudio en 0.2 M de NaCl aún sabiendo la influencia de cualquier anión y catión externo (Tandford, 1962) fue para hacer más homogéneos los resultados con la asignación y la estructura que ya habían sido obtenidas (Rico et al., 1989; Rico et al., 1991). Como la concentración salina es muy alta, las interacciones entre estos iones y el resto de la proteína pueden considerarse despreciables.

El estudio de todos los pK_a s de los protones de Ribonucleasa A, ha permitido detectar varias interacciones importantes para la estructura terciaria de la proteína. Estas se estudian en el apartado 2.3.3. Todas ellas motivan que prácticamente los desplazamientos químicos de los NHs de los grupos implicados presenten los mayores cambios en las resonancias de la Ribonucleasa (Tabla II.1), concretamente el valor encontrado en Arg 10, es el más grande, debido a que al imponer la restricción de que el valor de su punto de inflexión coincida con el del Glu 2, la región correspondiente a la zona protonada, es ajustada en el proceso de convergencia (para la His 105, el proceso de convergencia no

discurría adecuadamente con lo que no fue posible obtener el desplazamiento químico de la porción ácida y por tanto calcular el cambio en el mismo).

Para obtener los pK_a s de los grupos titulables se hizo uso de las inflexiones que presentaban los protones de ese grupo y de otras, no necesariamente adyacentes en la secuencia primaria, que podrían deberse al grupo que estábamos estudiando.

Tabla II.1

Los mayores cambios observados en las resonancias de los protones NHs de Ribonucleasa A en el rango de pH de 2.5 a 8.5.

Residuo	$\Delta\delta$ (ppm)	Residuo	$\Delta\delta$ (ppm)
NH ϵ de Arg 10	3.35	Lys 66	2.13
Thr 45	0.82	Ser 80	2.10
Ser 50	1.00		

El único residuo que no se encuentra entre los arriba comentados es la Thr 45, que está implicada en el centro activo, pero cuyo protón presenta como se verá el resultado de varias interacciones.

Los protones peptídicos que no están implicados en enlaces de hidrógeno se dejan de observar por efecto de su intercambio con el disolvente a medida que aumenta la basicidad del medio (Englander & Kallenbach, 1984); los protones que están unidos a otro tipo de nitrógeno, como los de las cadenas laterales, se van intercambiando también con el pH, y sólo permanecen a pH = 8.2, los que se encuentran más enterrados en la estructura: Gln 55, Gln 60, Asn 62 y Asn 71. De todas formas como el intercambio de las cadenas laterales (Wüthrich, 1986) es mayor en los pHs extremos, a pH = 2.5 no se observan los de Asn 34 y Gln 69. Los NH(ϵ) de las Argininas varían mucho en su comportamiento de intercambio, pues mientras las dos que están implicadas en sendos enlaces de hidrógeno dejan de observarse a pH = 6.5, las que no lo están no se observan a partir de pH = 7.5 para la Arg 39 y de 4.0 para la Arg 85. En cambio los dos únicos protones correspondientes de las cadenas laterales correspondientes a la Ser 75 y Tyr 97, que están muy inaccesibles y unidos por puentes de hidrógeno, permanecen durante todo el intervalo de pH.

La posibilidad de tener una fuente de resultados teóricos para todos los aminoácidos titulables (Matthew & Richards, 1982), ha permitido comparar a éstos con los valores experimentales. Los resultados han sido sorperendentes, pues en la mayoría de los casos los valores calculados son mayores que los medidos (incluso para los que ya se tenían resultados experimentales como para las tirosinas más enterradas en la estructura). La razón de esta aparente estabilidad de los grupos ácidos, en los resultados calculados, hay que buscarla en las deficiencias del modelo de Tandford-Kirwood empleado (y no en la diferencia de fuerza iónica, como en un principio podría pensarse, con que están realizados los cálculos y las medidas experimentales), pues aún a pesar de considerar que las cargas tienen un parámetro de enterramiento que mide su accesibilidad a la superficie, no se puede considerar que estas sean estáticas. Asimismo tal modelo no sopesa adecuadamente la interacción con otros tipos de cargas al desconocer con exactitud la posición de éstas. Los únicos residuos en los que los valores medidos son mayores que los calculados son Glu 49, Asp 38, Asp 83, Glu 86 y Asp 121, todos ellos cercanos a regiones donde existe una gran cantidad de carga positiva.

2.3.1 DETERMINACIÓN DE LOS pK_a s DE LOS RESIDUOS IONIZABLES DE RIBONUCLEASA A.

Residuos ácidos: equilibrio carboxilo-carboxilato.

En la Tabla II.2. se recogen todos los cambios en los desplazamientos químicos, $\Delta\delta$, adscritos a la titulación de grupos ácidos para los protones del propio residuo que son capaces de "sentirlo" (exceptuando el Asp 14, para el que no es posible observar su titulación). Como puede observarse, el cambio es siempre positivo, consecuencia lógica de que al disociarse el protón la carga negativa en el grupo carboxilato es mayor y por tanto el apantallamiento también lo es. Únicamente se detectan las excepciones correspondientes a los protones H_α de Asp 38, Asp 53 y Glu 86, y el NH de Asp 38. Estas anomalías pueden explicarse por la presencia de cambios en el entorno de los residuos que también modifican el δ . Obsérvese asimismo que estos residuos se encuentran en zonas donde existe también otro, u otros, grupos ácidos, o cadenas laterales cargadas con los que presentan fenómenos de cooperatividad o anticooperatividad, como se describe más abajo.

En general, los $\Delta\delta$ son mayores para los protones que se encuentran más cercanos al grupo que se disocia, y van disminuyendo a medida que aumenta la distancia a él. Así, los protones H_β de un residuo aspártico tienen un mayor $\Delta\delta$ que el protón NH del mismo residuo.

Tabla II.2

Cambios en $\Delta\delta$ (ppm) para los protones de los residuos ácidos de Ribonucleasa A.

Residuo	Protón	$\Delta\delta$ (ppm)	Residuo	Protón	$\Delta\delta$ (ppm)
Glu 2	$H_{\gamma 3}$	0.27	Asp 83	NH	0.75
				$H_{\beta 2}$	0.34
				$H_{\beta 3}$	0.29
Glu 9	NH	0.14	Glu 86	NH	0.42
	$H_{\beta 2}$	0.13		H_{α}	-0.12
	$H_{\beta 3}$	0.07			
	$H_{\gamma 3}$	0.14			
Asp 38	NH	-0.13	Glu 111	NH	0.11
	H_{α}	-0.18		$H_{\gamma 2}$	0.28
	$H_{\beta 2}$	0.30		$H_{\gamma 3}$	0.17
	$H_{\beta 3}$	0.23			
Glu 49	NH	0.46	Asp 121	NH	0.49
	H_{α}	0.09		$H_{\beta 2}$	0.18
	$H_{\beta 2}$	0.13		$H_{\beta 3}$	0.27
	$H_{\beta 3}$	0.16			
	$H_{\gamma 2}$	0.25			
	$H_{\gamma 3}$	0.06			
Asp 53	NH	0.16	Val 124	NH	0.26
	H_{α}	-0.07		H_{α}	0.25
	$H_{\beta 2}$	0.27		H_{β}	0.13
	$H_{\beta 3}$	0.38			

Observando los resultados que se muestran en la Tabla II.2 podemos ver que en los protones H_β de los aspárticos (que son como se ha comentado los que "sienten" más fuertemente la desprotonación) siempre existe uno que posee un $\Delta\delta$ mayor que el otro. Es decir, dependiendo de su orientación respecto al carboxilato su desplazamiento químico está más afectado por la titulación que la del otro, lo que es de utilidad para asignarlos estereoespecíficamente. Asimismo los $\Delta\delta$ s observados, suelen ser del mismo orden para casi todos los residuos (en promedio, de 0.32 ppm y 0.26 ppm, respectivamente). La única excepción es el Asp 121, el cual a pesar de presentar también una diferencia en los $\Delta\delta$ de sus protones H_β su magnitud es menor que la observada para el resto.

El único aspártico para el que se han asignado estereoespecíficamente sus protones H_β es el Asp 121, en el que al protón $H_{\beta 2}$ le corresponde el $\Delta\delta$ menor y al $H_{\beta 3}$ el mayor. Con estas bases y teniendo en cuenta que para el resto de los residuos aspárticos siempre hay una diferencia constante entre los desplazamientos químicos de uno y otro protón H_β , podemos asignar estereoespecíficamente los protones $H_{\beta 2}$ y $H_{\beta 3}$ de los restantes residuos (Tabla II.3).

Para los protones $H_{\gamma 2}$ y $H_{\gamma 3}$ de los Glutámicos no es posible encontrar una correlación similar debido a la carencia de datos experimentales (la mayoría de los protones H_γ de Glu 2 no superan el límite establecido de $\Delta\delta \geq 0.05$ ppm y los de Glu 86 solapan con otros protones); sin embargo, por los datos de que se dispone parece que uno de los protones ha de poseer un $\Delta\delta \approx 0.25$ ppm.

Tabla II.3

Estereoespecificidad de los protones $H_{\beta 2}$ y $H_{\beta 3}$ de los residuos aspárticos de Ribonucleasa A, basada en los cambios de $\Delta\delta$ (ppm).

Residuo	δ (ppm)	Estereoespecificidad	$\Delta\delta$ (ppm)	Residuo	δ (ppm)	Estereoespecificidad	$\Delta\delta$ (ppm)
Asp 38	2.77	$\beta 3$	0.30	Asp 83	2.63	$\beta 3$	0.34
	2.61	$\beta 2$	0.23		2.62	$\beta 2$	0.29
Asp 53	3.06	$\beta 2$	0.27	Asp 121	2.07	$\beta 2$	0.18
	2.60	$\beta 3$	0.38		2.23	$\beta 3$	0.27

En la Tabla II.4 se resumen todos los pK_a s de los residuos ácidos de Ribonucleasa A bovina.

El NH, H_α , uno de los protones H_β y uno de los H_γ de Glu 2, "sienten" la titulación de su cadena lateral (Fig II.3). El valor obtenido para el pK_a muy bajo respecto al pK_a intrínseco, pK_{int} , pero concuerda bien con el calculado por el modelo teórico de Matthew y Richards (Matthew & Richards, 1982). Su desplazamiento hacia pHs más ácidos, es sin duda debido al efecto de la carga electropositiva del extremo N-terminal próximo, al macrodipolo de la hélice I que comienza en el residuo siguiente (Hol et al., 1981), a la accesibilidad estática de la carga (0.72, la cual está de acuerdo, con el valor de la accesibilidad en las estructuras de Ribonucleasa A establecidas en disolución; Santoro et al, 1993) y posiblemente a su implicación en el puente salino con Arg 10, como se comenta en el apartado 2.3.3. Por esta razón la energía de interacción, correspondiente a la protonación del grupo carboxilato es negativa (Tabla II.2) y los distintos protones muestran un índice de Hill diferente de la unidad, reflejando el distanciamiento de cada uno al grupo que titula: para el H_γ es cooperativa, para el H_α la transición es normal y en el NH es fuertemente anticooperativa. (este efecto será prácticamente general en todos los residuos que posean grupos ionizables en una cadena lateral). El hecho de que un protón H_β y uno H_γ no titulen (de acuerdo al convenio tomado de que $\Delta\delta \leq 0.05$ ppm) puede explicarse como consecuencia de la influencia de la carga de los aminoácidos Lys 7 y Arg 10, próximos al residuo ácido, como lo muestran los NOEs, observados entre protones de ambos.

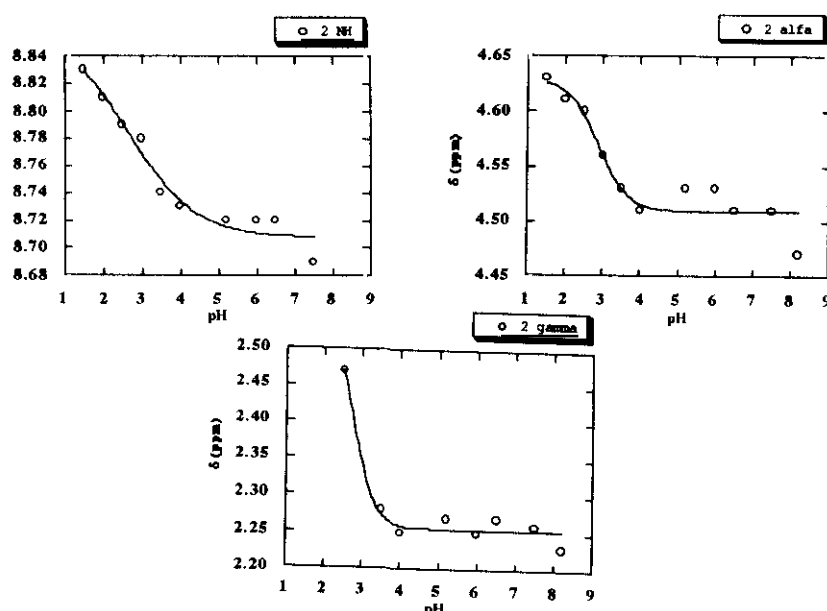


Fig II.3: Curvas de titulación de los protones de Glu 2.

Otros protones afectados por la titulación de Glu 2 y que se han empleado para calcular su pK_a son: el NH de Thr 3 (Fig. II.4), y el NH, uno de sus H_γ , el $H_{\delta 2}$ y $H_{\delta 3}$, y

el NH_ϵ de la Arg 10 (Fig II.31). El hecho de que el NH_ϵ de este último residuo se observe hasta el pH neutro (se observa hasta $\text{pH} = 6.50$) y presente una gran variación en su valor de δ , coincidiendo con el pK_a aparente de Glu 2, nos indica que las dos cadenas laterales están implicadas en un puente salino: Arg 10 NH_ϵ con el carboxilo de Glu 2, aún cuando no se hayan podido observar señales NOEs entre ambos residuos (véase más abajo). Este puente salino motiva que el NH , un protón H_β y uno de los H_γ de Gln 11 (Fig. II.2 b) titulen igualmente con el pK_a de Glu 2. El hecho de que únicamente se observen las titulaciones en uno de los dos protones geminales H_β y H_γ de la cadena lateral, es índice de una orientación preferida de ésta. Esto es otro ejemplo de cómo el efecto de las cargas electrostáticas sobre los desplazamientos químicos pueden proporcionar información acerca de la conformación de la cadena y de la estereoespecificidad de los protones.

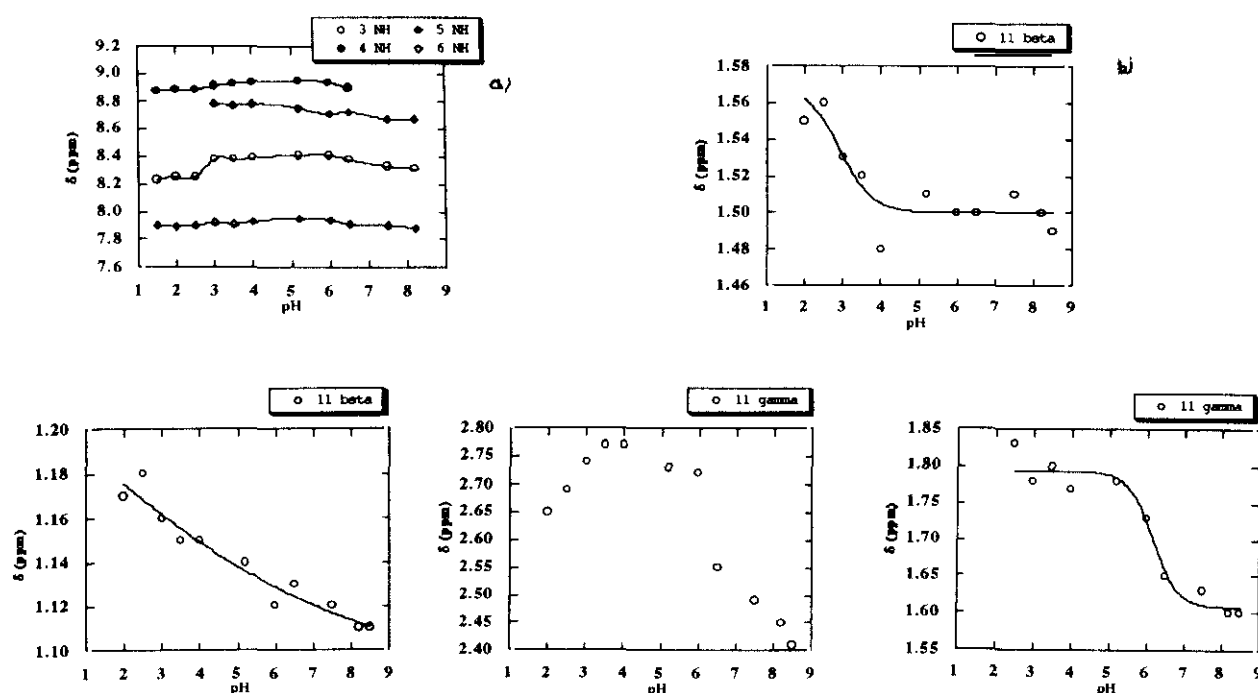


Fig II.4: a) Curvas que muestran la titulación del NH de Thr 3, NH 4, NH 5 y NH 6.
b) Curvas que muestran la titulación de los protones H_β y H_γ de Gln 11.

El otro residuo que siente la presencia de Glu 2, es la His 12: su NH (con otra titulación a pH básico atribuible a su anillo imidazólico), su protón H_α y uno de sus protones H_β , ven influidos sus desplazamientos químicos por la presencia del grupo carboxilo.

En la determinación del pK_a de Glu 9 (Fig II.5), se han empleado los protones H_γ de la cadena lateral. El valor obtenido está desplazado hacia pHs bajos, respecto a su pK_a intrínseco, y de aquí su energía de interacción negativa. Ello es debido al entorno electro-

positivo que rodea a este residuo (Lys 7, His 12, Lys 41 e His 119). El NH de Glu 9 presenta una titulación adicional a pH básico, que es atribuible a la presencia de la His 12. Los otros dos residuos que "sienten" la influencia de la titulación del carboxilato de Glu 9 son residuos que se encuentran cercanos en la estructura helicoidal (como se pone de manifiesto por los NOEs observados): la Ala 6, cuyo NH no titula ($\Delta\delta \leq 0.05$ ppm), pero su protón H_α sí, el cual muestra el pK_a de Glu 9 en una transición prácticamente normal, y la Met 13, uno de cuyos protones H_β se ve afectado también por la titulación de Glu 9.

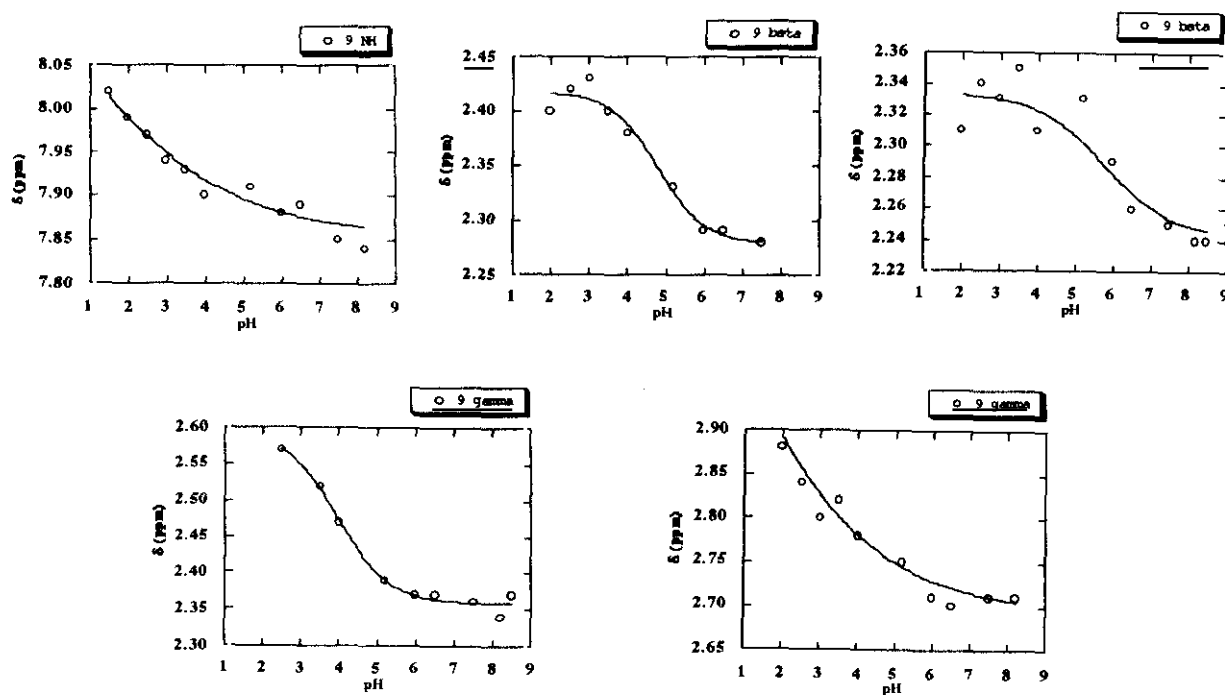


Fig II.5: Curvas de titulación de los protones de Glu 9.

El comportamiento anómalo de un grupo ácido de la Ribonucleasa A, fue advertido en los primeros estudios que se realizaron sobre los equilibrios de ionización del enzima (Tandford, 1962). Hermans y Scheraga (Hermans & Scheraga, 1965) en experimentos de transferencia, observaron que la proteína poseía un grupo ionizable con un pK_a extraordinariamente bajo (menor de 2.0); era evidente que tal grupo, por consideraciones electrostáticas, se había de encontrar en un entorno muy electropositivo (Tandford, 1962). En el estudio que hemos realizado, ninguno de los grupos ácido presenta un pK_a tan bajo, con excepción de Asp 14 (Fig II.5). Como se deduce de las titulaciones que muestran los desplazamientos químicos de sus protones, ninguna de ellas corresponde a la de un grupo ácido que se encuentre rodeado de un entorno positivo, y por tanto muy desestabilizado. Es más, el alto valor del índice de Hill, así como el punto de inflexión, nos indica que lo que "sienten" los protones del Asp 14, en el rango de pHs que hemos utilizado es la interacción de varios grupos: posiblemente todos los implicados en el

centro activo, además de His 48 y Glu 49. Las investigaciones realizadas sobre el S-péptido al encontrarse libre o unido a la S-proteína (Niu et al, 1974), probaron que este residuo participaba en la unión entre ambos fragmentos situándose en un entorno muy electropositivo, con un pK_a estimado de 2.41. La incertidumbre de los resultados experimentales expuestos en dicho trabajo es muy grande (Fig 3, en dicho artículo), con lo que no es de extrañar que en la Ribonucleasa A, el valor de la constante de ionización sea todavía más bajo.

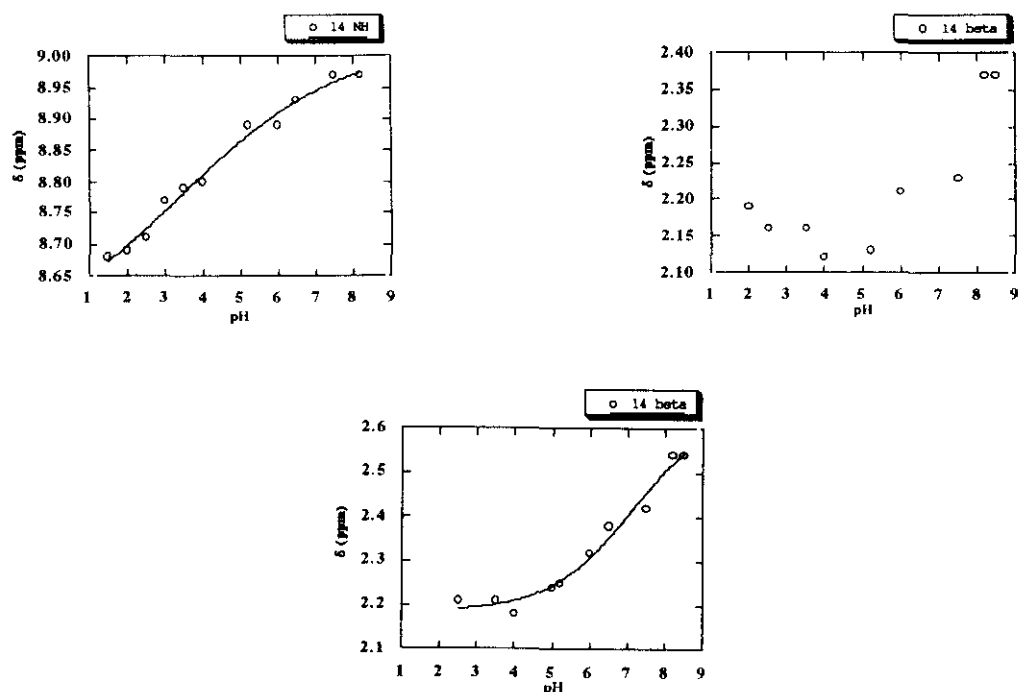


Fig II.5: *Curvas de titulación de los protones de Asp 14.*

Hasta ahora, ninguno de los protones estudiados presenta una titulación a pHs muy bajos, salvo algunos de la primera hélice, que se explicarán más abajo, considerando un equilibrio entre las dos especies de proteína, nativa y desnaturalizada. Sin embargo, residuos muy próximos a Asp 14, sí presentan esta titulación: Thr 17, Ala 19 y Ala 20 fundamentalmente. El hecho de que los protones de Asp 14, no "sientan" la titulación del propio carboxilato se debe a la circunstancia de que su pK_a debe estar lo suficientemente lejos del último pH medido (1.5), como para que la población de forma nativa con el grupo carboxilato protonado sea despreciable (Fig II.5).

Los otros residuos afectados por la titulación de Asp 14 son la Thr 17, Ala 19 y Ala 20.

En la Thr 17 (Fig. II.6), el protón peptídico titula a pHs muy ácidos. En la estruc-

Tabla II.4

Valores de los pK_a s medidos para los residuos ácidos de Ribonucleasa A (entre paréntesis se incluye la incertidumbre). Las energías libres de interacción, ΔG , están en $Kcal\ mol^{-1}$. Se usa la nomenclatura IUPAC-IUB para nombrar los aminoácidos.

Aminoácido	pK_a^{med}	$pK_a^{cal\ (a)}$	$pK_a^{int\ (a)}$	Accesi. (a)	ΔG	Residuos (b)
E 2	2.7 (± 0.2)	2.98	4.5	0.30	-2.5	E2, T3, R10, Q11 e H12
E 9	3.8 (± 0.2)	4.35	4.5	0.72	-0.9	A6, E9 y M13
D 14	< 1.5	2.2	4.0	0.26	< - 3.5	T17, S16, S18, A19, A20 y F46
D 38	2.8 (± 0.3)	1.66	4.0	0.02	-1.6	T36, D38 y R39
E 49	4.7 (± 0.2)	3.76	4.5	0.28	0.2	E49, M79 y S80
D 53	3.8 (± 0.1)	4.07	4.0	0.44	-0.2	D 53, S50 y Q60
D 83	3.7 (± 0.3)	2.73	4.0	0.33	-0.4	D83 y C84
E 86	4.0 (± 0.3)	3.76	4.5	0.49	-0.7	E86, T87, S90, K91, T92, C95, A96 y K98
E 111	3.5 (± 0.2)	4.34	4.5	0.78	-1.4	C110 y E111
D 121	3.1 (± 0.2)	2.3	4.0	0.03	-1.3	A64, C65, N67, K66, G68, Q69, C72, I106, I107, V108, H119, F120, D121 y A122
V 124	2.3 (± 0.3)	3.72	3.6	0.75	-1.8	A122, S123 y V124

(a) De Matthew & Richards (1982).

(b) Aminoácidos en los que alguno de sus protones ve afectado su desplazamiento químico por la titulación del grupo considerado, y que se han usado para la determinación del pK_a aparente.

tura en disolución (Santoro et al., 1993) se ha visto la implicación de este protón en un puente de hidrógeno con el CO del Asp 14. Esta titulación debe pues corresponder fundamentalmente a la titulación de Asp 14, discutida más arriba. El protón H_α no titula, pero sí lo hacen su protón H_β con una transición muy anticooperativa (con un $n \approx 5.0$, el mayor registrado en esta proteína, junto con el del protón NH de Asp 14), y su Metilo(γ) con un pK_a , que se identifica con el que "sienten" los protones aromáticos de Tyr 25, esto es, corresponden a la titulación del anillo imidazólico de His 48, pero mientras allí eran transiciones cooperativas aquí es una transición normal ($n \approx 1.0$), posiblemente indicando la cercanía al anillo del metilo de la Treonina. El alto valor de la anticooperatividad del protón H_β y de su pK_a aparente, nos indican que esta transición es la suma de los varios efectos electrostáticos de Asp 14, His 48 y posiblemente de Asp 83 y Arg 85.

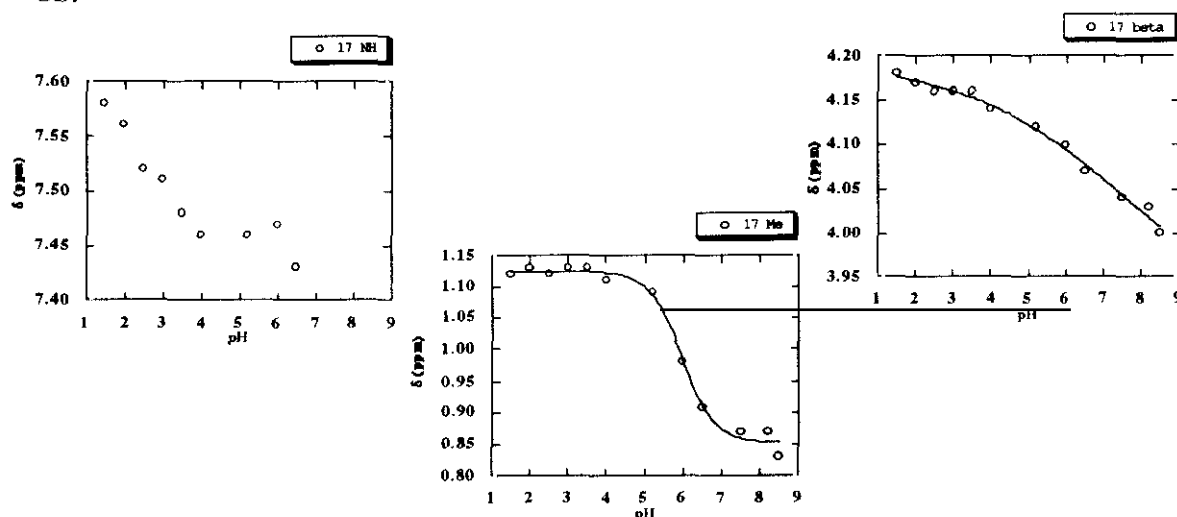


Fig. II.6.: Curvas mostrando la titulación de los protones de Thr 17.

En Ala 19 y Ala 20 (Figs. II.7 y II.8), todos sus protones presentan dos titulaciones: una a pHs muy ácidos característica de Asp 14, y otra a $pH \approx 6.0$, característica de la desprotonación de His 48. Para la Ala 19, esta segunda titulación muestra pK_a s e índices de Hill ligeramente anticooperativos, prácticamente iguales en el NH y el Metilo(β), en cambio su protón H_α posee una transición normal. La situación es completamente distinta para la Ala 20, pues mientras el protón NH titula con una transición normal, los protones H_α y Metilo(β), presentan transiciones cooperativas (con el mismo valor de pK_a obtenido para el protón H_β y los aromáticos de la Tyr 25 y anticooperativas, respectivamente. Lógicamente estas transiciones que se alejan del comportamiento normal, tanto en un sentido como en otro, no reflejarán un pK_a aparente que corresponda al de la His 48, debido a la diferente accesibilidad y aproximación de cada uno de los protones al grupo que titula.

Estas titulaciones se han observado también con la proteína que proviene de

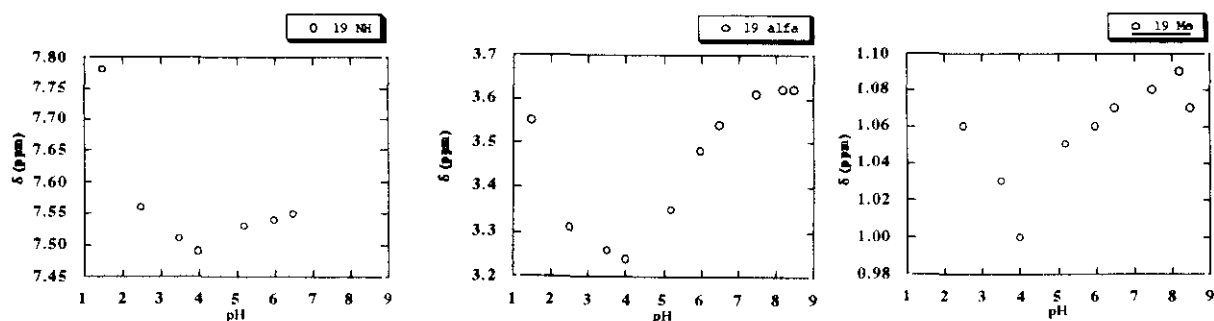


Fig. II.7.: *Curvas que muestran la titulación de los protones de Ala 19.*

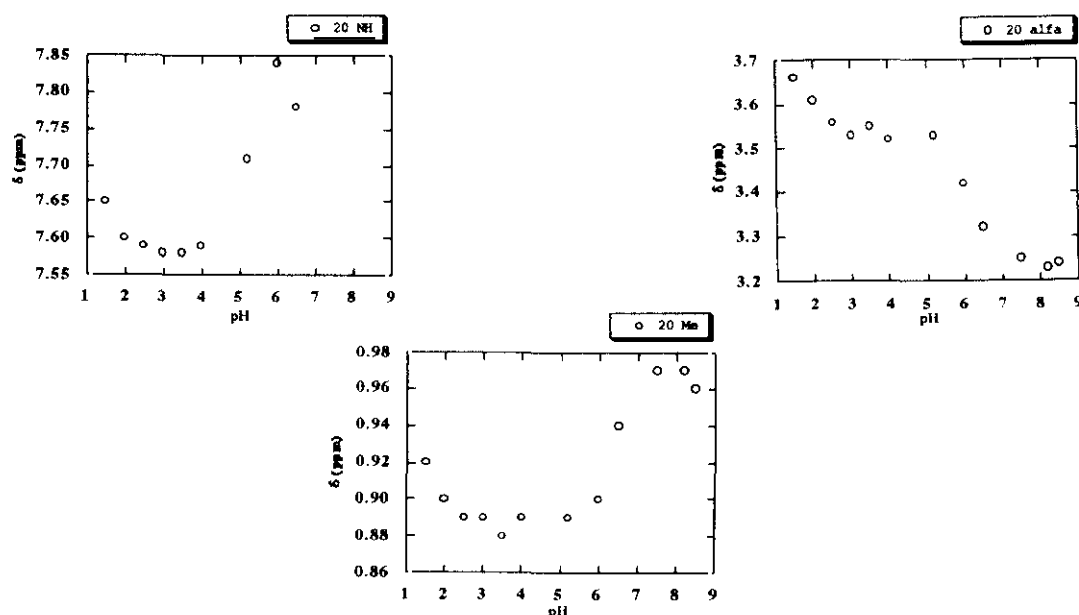


Fig. II.8.: *Curvas que muestran la titulación de los protones de Ala 20.*

Worthington (libre de fosfato) en lugar de la de Sigma. Los resultados fueron equivalentes (Fig II.9), por lo que esta titulación a pHs neutros no se debe a la ionización del grupo fosfato. La presencia de éste se manifiesta en la diferencia de desplazamientos químicos en uno y otro caso.

El Asp 38 (Fig II.10) es el siguiente residuo ácido. Matthew y Richards (Matthew & Richards, 1982) predijeron que este residuo es el que habría de poseer el más bajo valor de pK_a , (con un $pK_a < 2.0$) en la Ribonucleasa A (Hermans & Scheraga, 1965). Aunque las razones no aparecen suficientemente claras, es razonable adscribir ese pK_a , tan anormalmente bajo, a la presencia de un gran número de cargas positivas (Arg 33, Lys 37, Arg 39 y Lys 41), como fue sugerido en principio por Tandford (Tandford &

Hauenstein, 1956). Sin embargo, las medidas realizadas en este trabajo experimental, demuestran inequívocamente que el aminoácido que posee el menor pK_a es el Asp 14, el cual tiene un entorno electropositivo mucho mayor que el del Asp 38. El valor encontrado experimentalmente para este último residuo está desplazado hacia pHs ácidos, debido sin duda a la influencia del entorno electropositivo y a la accesibilidad del propio residuo (entre el 80 % y 90 %; Santoro et al., 1993), que contrasta con el valor de la accesibilidad en el cristal. Los protones que se han usado para la determinación del pK_a han sido los de todos los protones de dicho residuo, los H_α y H_β de Thr 36, y los NH y H_α de Arg 39.

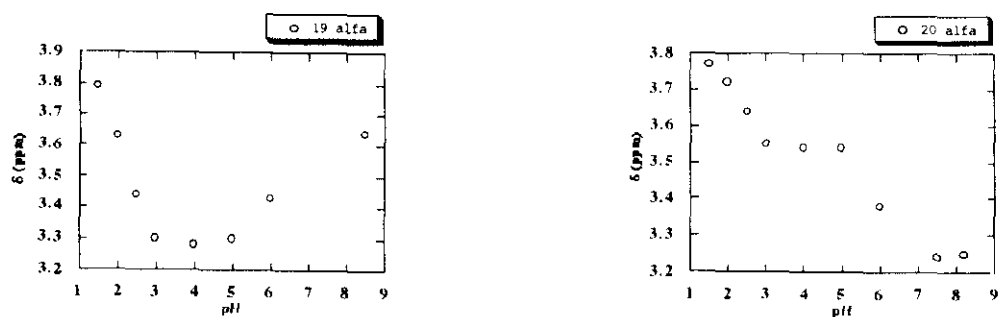


Fig. II.9.: Curvas que muestran la titulación de los protones de Ala 19 y Ala 20 en Ribonucleasa A tipo Worthington..

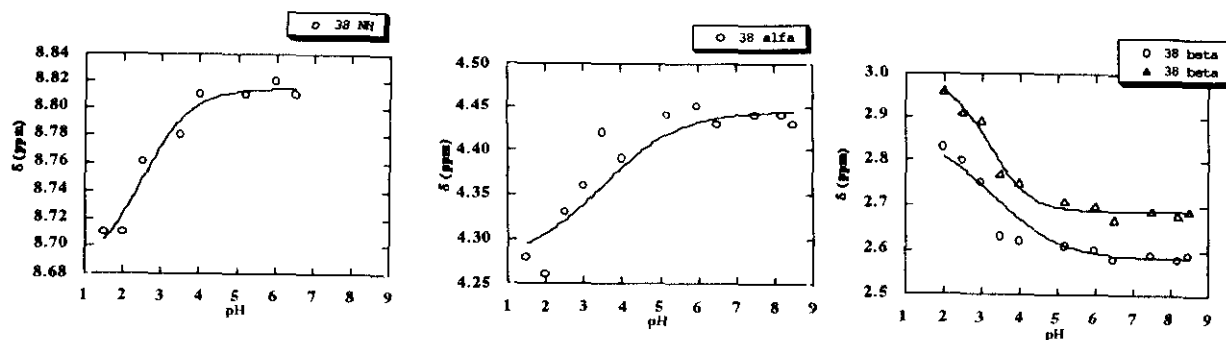


Fig. II.10.: Curvas que muestran la titulación de los protones de Asp 38.

El siguiente residuo es el Glu 49 (Fig. II.10), que por su proximidad al otro residuo ácido Asp 53, se comentarán juntos. Los pK_a s de ambos quedan perfectamente definidos por los propios protones de los dos aminoácidos. Existen además dos interacciones terciarias que definen la estructura de la proteína y caracterizan con mayor precisión la titulación de ambos grupos: el puente de hidrógeno entre el NH de la Ser 50 y la cadena lateral de Asp 53 y el puente de hidrógeno entre el protón NH de la Ser 80 y la cadena lateral de Glu 49. Por ello se han usado para determinar el valor del pK_a de Glu 49, los de sus propios protones, los protones H_γ de Met 79 y el del NH de Ser 80, y para el Asp 53, el del NH de Ser 50 y los del propio residuo.

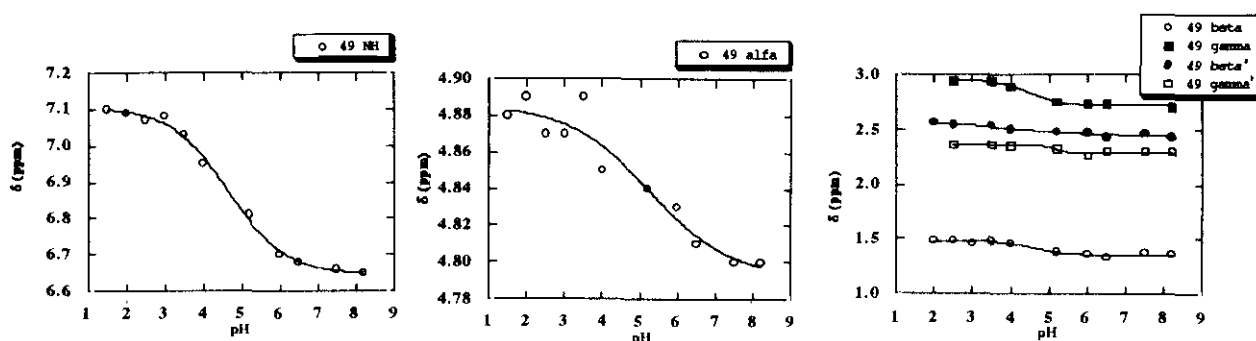


Fig.II.10 : *Curvas de titulación de los protones de Glu 49.*

A pesar de la proximidad de ambos residuos, sus equilibrios de ionización muestran un comportamiento muy diferente. Así Asp 53 (Fig. II.11) tiene índices de Hill anticooperativos y su energía de interacción ligeramente negativa (Tabla II.4), mientras que para los de Glu 49 la transición es cooperativa en la mayoría de los casos. No obstante, si el pK_a intrínseco de ambos es esencialmente el mismo (Tabla II.4), ¿por qué el Asp 53 titula con un pK_a más bajo que Glu 49 y no al revés?. Podemos dar dos posibles respuestas:

1.- El Asp 53 se encuentra en un entorno muy electropositivo, tanto por encontrarse en el extremo N-terminal de la hélice II (Hol et al., 1981), como por la presencia de la carga positiva del grupo del Glu 49). La desaparición de una carga negativa, como consecuencia de la protonación de un grupo carboxilato sería pues un factor desestabilizante, lo que motiva que el pK_a aparente sea más bajo (Tandford, 1962); esta repulsión electrostática explicaría los altos valores de n para el Asp 53, y el comportamiento normal ($n \approx 1.0$) de Glu 49, al estar rodeado de un

entorno ya poco cargado, al estar prácticamente neutralizada la carga positiva del macrodipolo de la hélice con la cadena lateral de Asp 53.

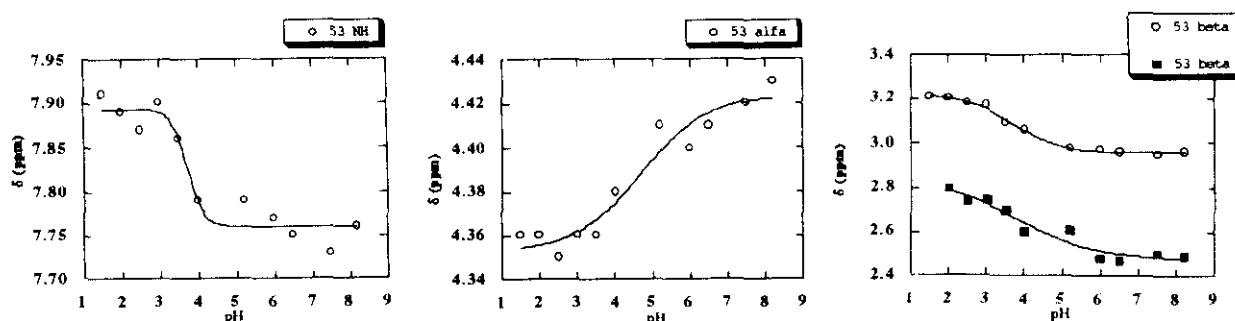


Fig. II.11.: *Curvas de titulación de los protones de Asp 53.*

2.- La segunda respuesta sería la que considera las diferentes accesibilidades estáticas de los grupos cargados en las cadenas laterales (Lee & Richards, 1971; Matthew & Richards, 1982): el grupo carboxilo de Glu 49, está más hacia el interior de la estructura de la proteína (Tabla II.3) que el de Asp 53, por lo que este resultará más accesible al disolvente, facilitando la reacción ácido-base (esta accesibilidad estática calculada está de acuerdo con los valores de accesibilidad encontrados para las estructuras en disolución para todo el residuo: para el Glu 49 está entre un 20% a un 30%, y para Asp 53 está entre un 50 % a un 60 %, tal como se deduce de la Fig I.8; Santoro et al., 1993).

Posiblemente los dos factores influyan para rebajar el pK_a de Asp 53, aunque resulta curioso que los valores predichos (Matthew & Richards, 1982) reflejen que el de menor pK_a sea el de Glu 49, debido quizás a una infravaloración del macrodipolo de la hélice y a una sobreestimación de la carga del anillo de His 48. Obsérvese que apoyando el hecho de esta interacción mutua está igualmente la circunstancia de los valores opuestos pero iguales de las energías de interacción electrostática, ΔG : lo que uno pierde en desestabilizarse, lo gana el otro en estabilización.

De igual manera que el protón H_α de la Ser 50 muestra un comportamiento anti-cooperativo, el protón H_α de Glu 49 y uno de sus protones H_β sienten la influencia del Asp 53 (e incluso la presencia de la His 48 en el caso del protón H_α), motivando que sus pK_a s resulten más altos de lo esperado y fuertemente anticooperativos (con n del orden de 2.5 y 3.3, respectivamente); de hecho, el protón H_β de Glu 49 presenta un pK_a aparente igual al del Asp 53 (y otro de sus H_γ presenta un valor ligeramente más alto, con un factor de Hill cooperativo). De nuevo observamos efectos muy específicos relacionados con la estereoespecificidad y orientación de las cargas respecto a los protones H_β y H_γ .

De todo lo dicho, pudiera deducirse que únicamente los posibles pK_a s aparentes de Glu 49 resultarían afectados por la presencia de 53. Sin embargo, esto no es así, pues también el pK_a del protón H_α de Asp 53, resulta afectado por la presencia de Glu 49.

Sin duda alguna, la fuerte anticooperatividad registrada en el protón H_α de Ser 50, se debe a la presencia del Glu 49. En general, prácticamente todos los NHs de esta zona presentan cambios en sus desplazamientos químicos con el pH, a diferencia de los demás protones del esqueleto y de las cadenas laterales. Las curvas obtenidas nos muestran un promedio de la influencia, cooperativa o no, de ambos grupos ácidos. El cambio en los NHs es, en la mayoría de los casos, cooperativo (con un $n < 1.0$), aunque existen algunos casos de comportamiento normal ($n \approx 1.0$) y anticooperativo. Curiosamente, los protones peptídicos de Leu 51 y Ala 52, los cuales están situados entre ambos grupos ionizables (y más expuestos al disolvente) presentan un fenómeno anticooperativo, probablemente reflejando el hecho de que los dos grupos se influyen mutuamente, pero de una manera coordinada. El alto valor de los pK_a s aparentes, muestran que la influencia del Glu 49 es mayor.

Las curvas de los NHs de los residuos 54 al 60 (Fig. II.12), exceptuando Gln 55, Val 57, Cys 58 y Ser 59, presentan valores de sus pK_a s aparentes entre los valores de ambos restos aunque más cercanos a los de Glu 49. La única excepción es Gln 60, cuya curva posee, para su NH, un pK_a exactamente igual al de Asp 53, con un índice de Hill de $n \approx 1.0$. Esta "extraordinaria sensibilidad", de dicho protón a la titulación de Asp 53, a pesar de la distancia que separa ambos grupos y a pesar de que Gln 60 no se encuentre muy enterrada, ha de adscribirse a la posible presencia en disolución de una molécula de H_2O , como la que en el cristal se encuentra unida a la cadena lateral de Gln 60 y a la del Asp 53 (Kim et al., 1992). Este es un ejemplo de como, las técnicas de titulación pueden permitirnos observar, de una forma indirecta, la presencia de una molécula de agua unida a una cadena lateral, que sólo había sido detectada por técnicas de difracción de Rayos X. Los protones de los grupos amidas de las cadenas laterales de Gln 55 y Gln 60 (Fig II.13), también "sienten" la titulación de Asp 53: la segunda como consecuencia del puente de hidrógeno citado (aunque uno de los protones lo "siente" de forma cooperativa y el otro anticooperativa, debido a la diferente orientación de estos respecto al grupo carbonilo) y la primera con una transición prácticamente normal.

Los dos próximos grupos ácidos son el Asp 83 y el Glu 86, cuya situación es análoga a la de los dos anteriores: los valores de los pK_a s medidos, son mayores que los obtenidos teóricamente e incluso las accesibilidades estáticas de las cargas (Lee & Richards, 1971) son mayores que las que se observan en disolución, donde el Asp 83 es más externo que el Glu 86 (Santoro et al., 1993).

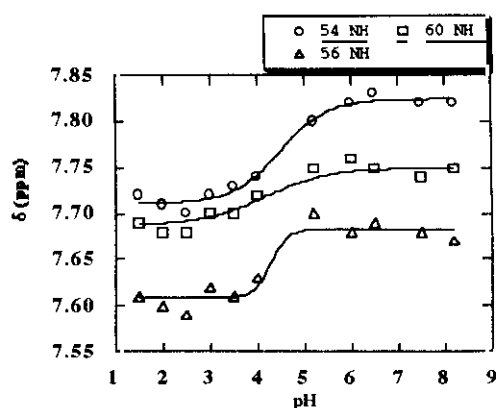


Fig. II.12.: Curvas que muestran la titulación de los protones NH de Val 54, Ala 56 y Gln 60.

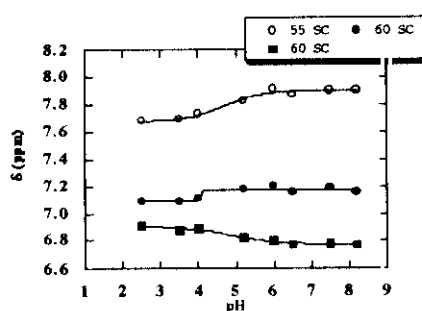


Fig. II.13.: Curvas que muestran la titulación de los protones amida de las cadenas laterales de Gln 55 y Gln 60.

Los protones de Asp 83 (Fig II.14) presentan todos un valor muy alto del índice de Hill, posiblemente debido a la presencia del anillo cargado de la His 48. Ello ha hecho muy difícil la evaluación exacta del pK_a aparente de los mismos. Para la determinación del mismo, se han tomado el NH de Asp 83 (aún presentando un elevado valor en el índice, consecuencia de la mayor polarizabilidad del enlace, Forman-Kay et al., 1992), el protón H_β con menor factor de Hill y uno de los protones H_β de Cys 84. Ni el resto de los protones de Cys 84, ni los de la Thr 82, sienten la influencia del grupo carboxilo de Asp 83, debido a la proximidad de la His 48, en la hebra β_1 , cuya disociación sienten todos los residuos de esta hebra.

En la estructura cristalina de Rayos X (Svensson et al., 1986), se ha encontrado que existen unas conformaciones correlacionadas entre Val 43, Asp 83 y Arg 85, con lo que es posible que exista una gran interacción entre las cadenas laterales de los tres residuos. Por otro lado en la medida de las constantes cinéticas del intercambio en la proteína desnaturizada térmicamente (Robetson & Baldwin, 1991) los resultados para estos residuos fueron anómalos confirmando la conclusión anterior.

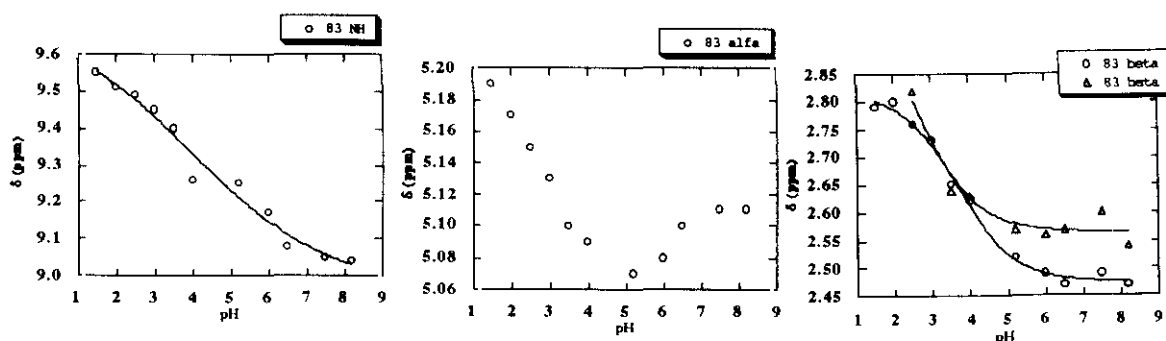


Fig. II.14.: *Curvas de titulación de los protones de Asp 83.*

El Glu 86 (Fig II.15), presenta también problemas en la determinación de su pK_a , pues sus protones (para algunos de los cuales no es posible construir una curva de titulación completa, debido al solapamiento con otros protones de otros residuos) presentan unos elevados índices de Hill. Por ello se ha recurrido a las titulaciones más "normales" que mostraban los residuos de β_1 , del giro III y de β_4 . No es tan fácil hacer aquí una discusión de los valores de los pK_a s de ambos residuos, pues el que presenta un menor valor es el que presenta la carga más enterrada. Por otro lado la influencia de la carga positiva de Arg 85 tan cercana a Glu 86, puede perturbar electrostáticamente la disociación de dicho grupo ácido.

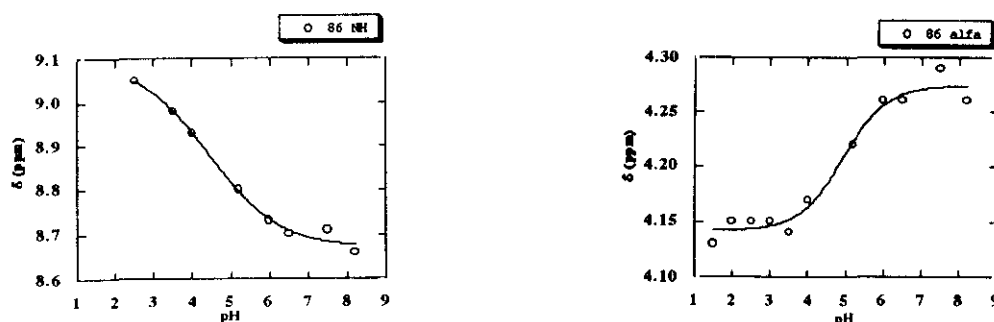


Fig. II.15.: *Curvas de titulación de los protones de Glu 86.*

A diferencia de lo que ocurría con el Asp 83, los valores de desplazamiento químico de muchos protones se afectan por la titulación de Glu 86, concretamente el residuo adyacente, Thr 87, los del segundo giro β , y los de la hebra β_4 , que están situados

"enfrente" del grupo ácido en la estructura de la lámina (véase Fig. III.5). En el segundo giro β , son nuevamente los NHs los que "sienten" más fuertemente la disociación del carbonilo. Las transiciones no son normales, sino que por el contrario, son muy anticooperativas, lo cual motiva que la determinación del pK_a del Glu 86, sea difícil. Posiblemente, esto se debe a que este giro se encuentra muy accesible al disolvente (Santoro et al., 1993) con lo que la constante dieléctrica y las capas de hidratación influyen considerablemente, distorsionando los efectos electrostáticos y por ende los pK_a s que siente cada protón. En la Tabla II.5. pueden verse cada uno de los pK_a s que sienten los protones de este giro, atribuibles a la titulación de Glu 86. Los de la hebra β_4 , concretamente los NHs de Ala 96 y Lys 98, se ven también influidos por la presencia del Glu 86, junto con uno de los protones H_β de Tyr 97, indicando nuevamente la estereoespecificidad de los protones de la tirosina). En la Fig. II.16 aparecen representados cada uno de los protones que titulan con el pK_a de Glu 86.

Tabla II.5

Residuos que presentan algún protón cuyo desplazamiento químico cambia por la disociación de Glu 86.

Residuo	pK_a del protón que titula	Implicación en la estructura
Ser 90	3.60 (NH); 3.63 (H_α)	Giro β II
Lys 91	4.14 (NH)	Giro β II
Tyr 92	3.98 (NH); 3.71 (H_α)	Giro β II
Pro 93	3.30 (H_α)	Giro β II
Cys 95	4.89 (NH); 4.12 (H_α)	Giro β II
Ala 96	4.46 (NH)	Hebra β_4
Tyr 97	3.44 ($H_{\beta 2}$)	Hebra β_4
Lys 98	3.98 (NH)	Hebra β_4

La determinación del pK_a de Glu 111 (Fig. II.17), se realizó con base en los protones de su cadena lateral y de la de Cys 110. Cada uno de éstos presenta unos valores en los índices de Hill muy diferentes, pues mientras uno de los protones H_γ y el

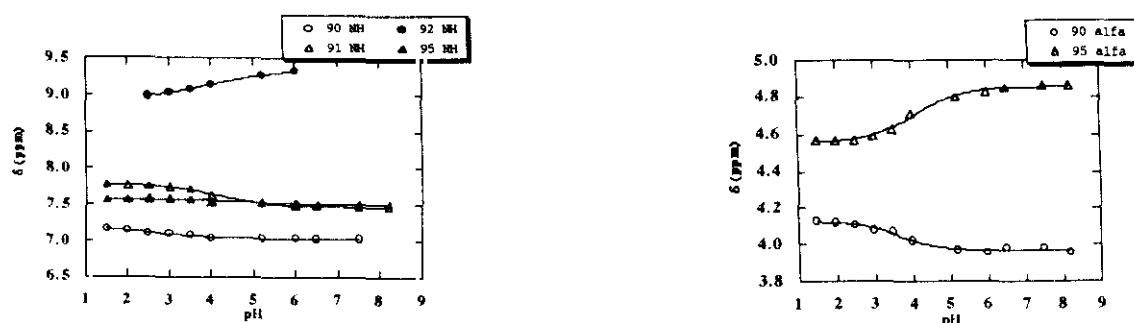


Fig. II.16.: a) Curvas que muestran la titulación de los protones NH de Ser 90, Lys 91, Tyr 92 y Cys 95. b) Curvas que muestran la titulación de los protones H_α de Ser 90 y Cys 95.

NH de Glu 111 presentan titulaciones que son "normales", el otro H_γ muestra una titulación cooperativa. Ninguno de los protones H_β presenta un cambio apreciable. El valor tan bajo del pK_a se debe al hecho de que dicho protón se encuentra en la proximidades del centro activo, una bolsa en la que abundan las cargas positivas. El que el valor obtenido sea inferior al calculado teóricamente (Matthew & Richards, 1982) es debido también a una infravaloración de la carga positiva de la región.

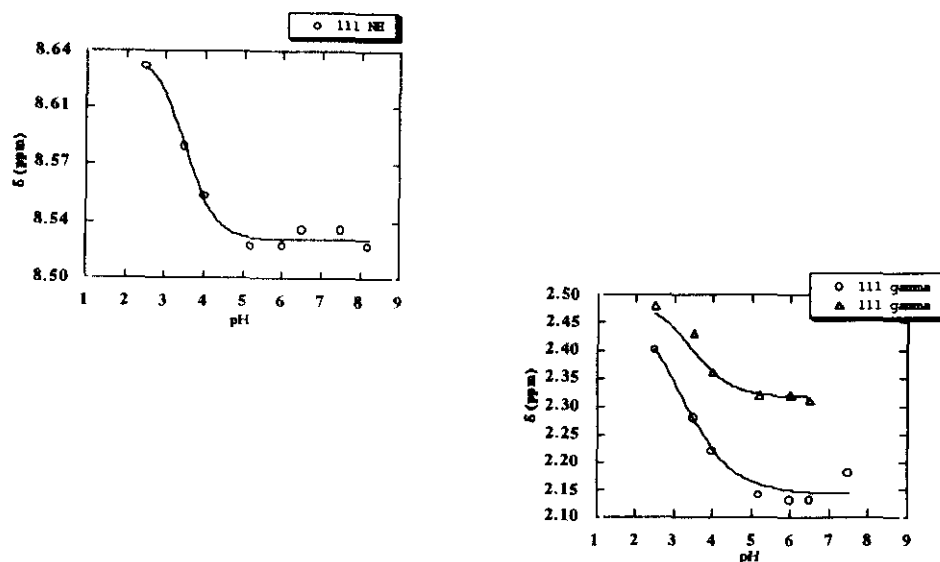


Fig. II.17.: Curvas de titulación de los protones de Glu 111.

El siguiente residuo ácido, el Asp 121 (Fig II.18), es posiblemente el residuo cuya titulación afecte a un mayor número de residuos más residuos lejanos en la secuencia y próximos espacialmente él. Debido al puente de hidrógeno que forma el carboxilato de la cadena lateral de Asp 121 con el NH de Lys 66, y que se discute más abajo, todos los

residuos del primer giro β , titulan con el pK_a de Asp 121. Los residuos de Ile 106, Ile 107 y Val 108, pertenecientes a la hebra β_6 , situadas en la hebra antiparalela "de enfrente" y los de His 119, Phe 120 y Ala 122, tanto por proximidad, como por pertenecer al centro activo también se afectan por el pK_a del grupo ácido. En la Tabla II.6, se indican todos los residuos que "sienten" esta influencia, aunque no todos han sido usados para la determinación del punto de inflexión.

Tabla II.6

Residuos que presentan algún protón cuyo desplazamiento químico cambia por la disociación de Glu 121.

Residuo	pK_a del protón que titula	Implicación en la estructura
Ala 64	3.28 (NH), 3.62 (H_α)	Giro β I
Cys 65	3.20 (NH), 2.89 ($H_{\beta 2}$), 3.20 ($H_{\beta 3}$)	Giro β I
Lys 66	3.09 (NH)	Giro β I
Asn 67	3.23 (NH)	Giro β I
Gly 68	3.11 (NH)	Giro β I
Gln 69	3.23 (NH)	Giro β I
Cys 72	3.10 (NH), 3.30 (H_α), 3.06 ($H_{\beta 2}$)	Hebra β_3
Ile 106	3.29 (H_α)	Hebra β_6
Ile 107	3.61 (NH)	Hebra β_6
Val 108	3.25 (NH)	Hebra β_6
His 119	3.58 (NH), 3.33 ($H_{\beta 2}$), 3.39 ($H_{\beta 3}$)	Hebra β_7
Phe 120	3.40 (NH), 3.12 (H_ϵ)	Hebra β_7
Ala 122	2.70 (NH)	Hebra β_7

El último residuo ácido, la Val 124 (Fig II.19), titula con un pK_a menor que el

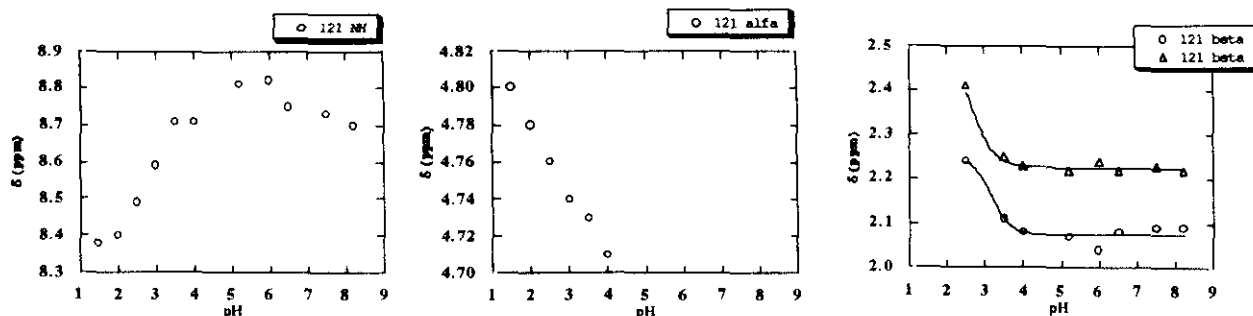


Fig. II.18.: *Curvas de titulación de los protones de Asp 121.*

calculado teóricamente (Matthew & Richards, 1982), debido a que en dicho trabajo no se considera la influencia de la His 105, que posee una elevada carga positiva. Los únicos residuos que "sienten" la titulación son los protones peptídicos de Ala 122, Ser 123 y todos los de Val 124. En el caso de la His 105, su protón peptídico "nota" la influencia de la desprotonación pero el hecho de que no sea observable la componente ácida, nos imposibilita la determinación de la inflexión.



Fig. II.19.: *Curvas de titulación de los protones de Val 124.*

Residuos básicos: Histidinas y extremo N-terminal.

Ninguno de los protones de la Lys 1, parece "sentir" la influencia de la desprotonación del extremo N-terminal. En cambio los NHs de los dos residuos adyacentes sí lo "notan", estableciendo un límite para el valor medido.

En la Ribonucleasa A, existen 4 Histidinas. Dos de ellas, His 12 e His 119 se encuentran en el centro activo e intervienen en la catálisis; las otras dos se encuentran en cada una de las láminas. La His 48 (primera lámina) está implicada en una transición conformacional dependiente del pH, y la His 105 (segunda lámina), presenta en disolución dos posiciones alternativas de su cadena lateral.

Las diferencias en los desplazamientos químicos por titulación, $\Delta\delta$ (Tabla II.7), son mayores en este caso, que las registradas para los grupos carboxilo, sin duda alguna debido a la aromaticidad del anillo. En todos los casos la forma "ácida" del equilibrio de ionización tiene mayor valor de δ que la forma básica, como cabría esperar con la presencia de una carga positiva. Normalmente, todos los protones del residuo titulan con el pK_a del anillo titulación que viene acompañada en algunos casos, de otras inflexiones

Tabla II.7

Cambios en $\Delta\delta$ (ppm) para los protones de los residuos de Histidina de Ribonucleasa A.

Residuo	Protón	$\Delta\delta$ (ppm)	Residuo	Protón	$\Delta\delta$ (ppm)
His 12	NH	0.23	His 105	NH	0.33
	H β	0.11		H α	0.07
	H δ^2	0.56		H β	0.20
	H ϵ^1	1.15		H β'	0.11
				H δ^2	0.49
His 48			His 119	H ϵ^1	1.03
	NH	0.29		NH	0.06
	H α	0.16		H α	0.29
	H β	0.37		H β	0.42
	H δ^2	0.45		H β'	0.10
	H ϵ^1	0.53		H δ^2	0.49
				H ϵ^1	1.04

debidas a otros grupos cercanos en la estructura tridimensional de la proteína. En todos los casos, $\Delta\delta$, son de las obtenidas por el procedimiento de cálculo, aunque en el caso de los protones aromáticos de His 48, han sido deducidas a partir de las observadas experimentalmente. Los protones aromáticos son los que presentan un mayor desplazamiento químico por titulación, $\Delta\delta$. Este va disminuyendo a medida que nos alejamos del anillo. Como puede observarse, el cambio en $\Delta\delta$ (≈ 0.5 ppm) para todos los protones H δ^2 es prácticamente el mismo independientemente del residuo que se trate,

alrededor de 0.50; lo que ocurre también con el otro protón aromático, H^{e1}, pero en este caso es $\Delta\delta \approx 1.0$. Las pequeñas diferencias entre todos ellos son debidas a la preponderancia de uno u otro tautómero en el anillo. La única excepción a este comportamiento general es el protón H^{e1} de la His 48, cuyo $\Delta\delta = 0.53$ ppm es más pequeño. Tanto este hecho como el desplazamiento químico a alto campo que muestra este protón en la forma proto-nada son consecuencia de la cercanía de los anillos aromáticos de Tyr 25 y Phe 46.

En la Tabla II.8 se tabulan los pK_as obtenidos.

Tabla II.8

Valores de los pK_as medidos para los residuos de Histidina y N-terminal de Ribonucleasa A (entre paréntesis se incluye la incertidumbre). Las energías libres de interacción (ΔG) están en Kcal mol⁻¹.

Aminoácido	pK _a ^{med}	pK _a ^{cal(a)}	pK _a ^{int (a)}	Accesi.(a)	ΔG	Residuos (b)
K 1	> 7	7.79	8.0	0.82		E2 y T3
H12	5.8 (±0.1)	6.27	6.6	0.17	-1.1	R10, Q11, H12, K41, T45 y F46.
H48	5.9 (±0.1)	6.52	6.0	0.02	-0.1	T17, A19, A20, H48, I81, T82, R85 y T99
H105 ^c	6.5	6.64	6.6	0.73	-0.1	S75, K104 e H105
H119	6.2 (±0.2)	6.68	6.0	0.12	0.2	A5, A109, V118, H119 y F120

(a) De Matthew & Richards (1982).

(b) Aminoácidos que son capaces de "sentir" en alguno de sus protones la influencia del grupo que titula, y que se han usado para la determinación del pK_a aparente.

(c) Los protones que se han usado para determinar el pK_a de His 105 muestran todos el mismo punto de inflexión de 6.50, de aquí que el error en la incertidumbre sea prácticamente el error en la medida de δ , esto es 0.02 ppm.

La His 12 se encuentra en la hélice del S-péptido e implicada en el centro activo. Su pK_a se ha obtenido a partir de las titulaciones del protón NH de Arg 10, la del protón H_γ de Gln 11, la de sus propios protones, la de los protones NH y H_α de Thr 45 y la de los protones H_β de Phe 46. Por estudios de RMN de ¹³C, se ha podido deducir (Walters & Allerhand, 1980) que el estado de esta His, es el tautómero menos común (Fig II.20):

$N^{\delta 1}\text{-H}$ (o $N^{\pi}\text{-H}$), lo cual concuerda con el punto de inflexión observado en este trabajo y el atribuido a dicho tautómero.

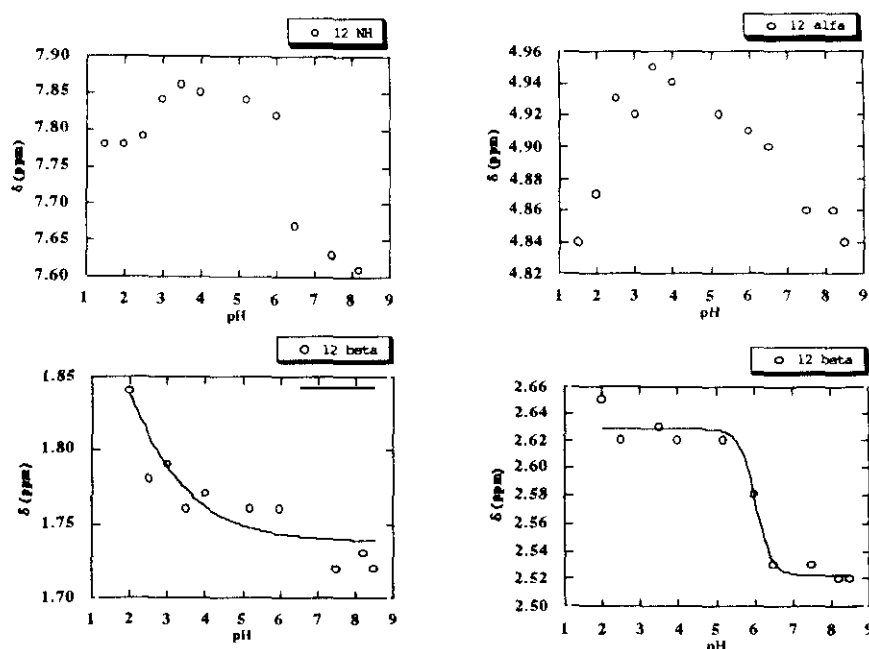


Fig. II.20.: Curvas de titulación de los protones NH , H_{α} y H_{β} de His 12.

El protón NH presenta, junto con la titulación de Glu 2, la titulación de su anillo, mientras que el valor de δ del protón H_{α} decae a pHs muy básicos y uno de los protones H_{β} muestra también el efecto de su anillo, junto con el efecto del puente salino (el otro, nuevamente indicando la estereoespecificidad, sólo muestra el efecto de Glu 2). Los dos protones del anillo imidazólico presentan un comportamiento anómalo. Así:

El protón $C2H$ (o $H^{\delta 2}$) (Fig. II.21 a) muestra una inflexión a pHs ácidos (entre 3 y 5) y presenta ligeras variaciones a pHs básicos (entre 7 y 8). Si intentamos ajustar los datos experimentales a la curva modelo que hemos establecido, resulta un pK_a aparente de 5.72, pero con un valor del índice de Hill ligeramente cooperativo ($n \approx 0.8$). La curva de titulación de este protón del anillo ha sido estudiada en detalle empleando modelos más sofisticados de la ecuación de Henderson-Hasselbach (Schechter et al., 1972), mostrando que estas interacciones en la parte ácida son debidas, conjunta o independientemente, a la proximidad de los carboxilatos de Asp 121 y Glu 9 (y por los resultados observados aquí para los otros protones de His 12, a la presencia de Arg 10 y su interacción con el Glu 2), mientras que la transición a pH básico es debida a la Lys 41. En otros estudios de la titulación de este residuo también se apunta la posible interacción entre esta cadena y la de la His 119. La existencia favorecida del tautómero del anillo imidazólico puede explicarse en base a dos razones: una considerando que la cadena lateral de Lys 41 se encuentra muy cercana a $C^{\delta 2}$ y $N^{\epsilon 2}$, por lo que no resultaría favorable electróni-

camente la presencia próxima del protón (al acumularse un exceso de carga positiva en una zona muy reducida), y en segundo lugar, porque en dicho tautómero se propicia la formación de un puente de hidrógeno del $H^{\delta 1}$ con el OH hidroxílico de la Thr 45 (Walters & Allerhand, 1980; Santoro et al., 1993), como se pone de manifiesto por ser el único protón NH imidazólico que se observa en la Ribonucleasa A.

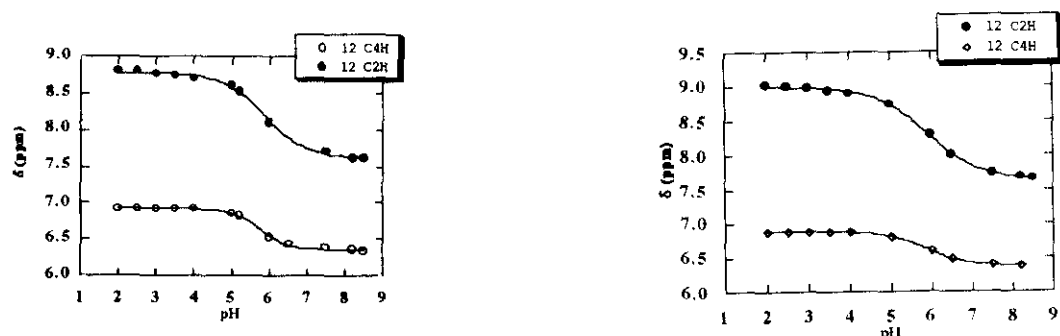


Fig. II.21.: a) Curva de la titulación de los protones imidazólicos $H^{\delta 1}$ y $H^{\delta 2}$ de His12 en proteína tipo Sigma. b) Curva de la titulación de los protones imidazólicos $H^{\delta 1}$ y $H^{\delta 2}$ de His 12 en proteína tipo Worthington.

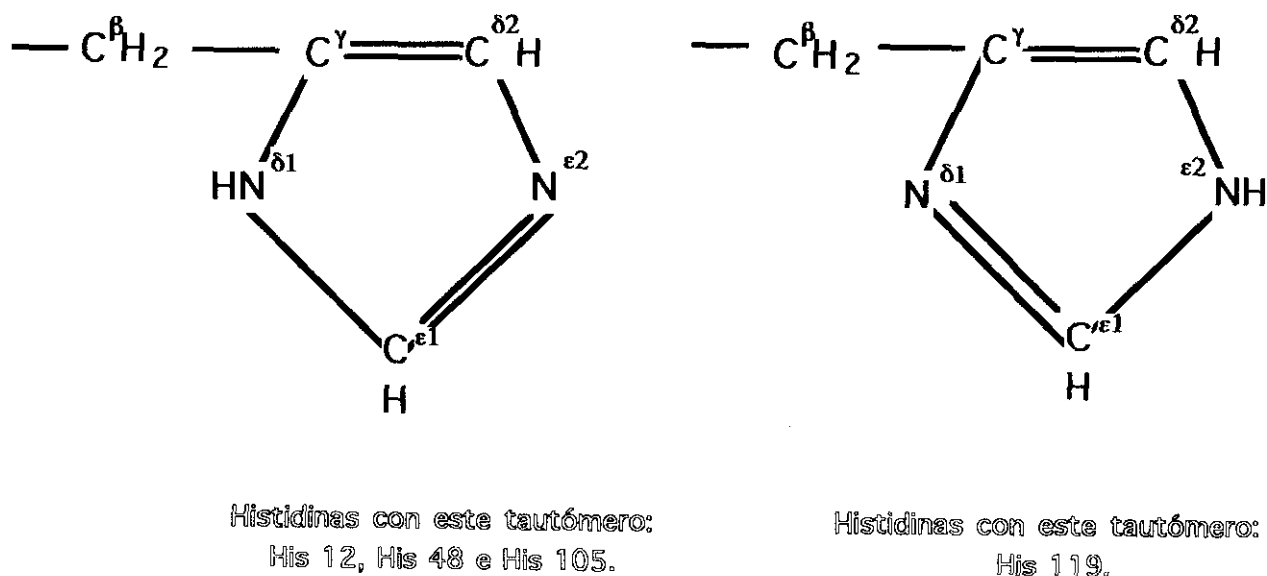


Fig. II.22.: Representación del estado tautomérico de los anillos imidazólicos de las Histidinas de Ribonucleasa A.

El protón C4H (o H^{ε1}) presenta (Fig II.21 a), en cambio, en la parte ácida una componente más lisa, indicando que no parece afectarle, por orientación del anillo, la presencia de cualquiera de los grupos ácidos indicados arriba. En cambio, si presenta más acusadamente la influencia de Lys 41 en la región básica.

Para ambos protones imidazólicos se han efectuado las titulaciones, en las mismas condiciones salinas y a la misma temperatura, con la proteína de Worthington (libre de fosfato, según las especificaciones), que aparecen representadas en la Fig II.20 b. En las correspondientes curvas de titulación aparecen también las anomalías encontradas para las muestras de proteína que contenían fosfato, aunque el pK_a aparente es ligeramente mayor en éstas debido a la presencia del fosfato, que posee una carga negativa en la proximidades del anillo.

Como puede observarse en la Tabla II.8, el valor del pK_a está muy desplazado hacia pHs ácidos el pK_a, de aquí el valor tan negativo en ΔG. Esta inestabilidad responde al hecho de que dicho anillo imidazólico se encuentra en un entorno muy electropositivo: la Lys 41 y el anillo de His 119 (ambos implicados en el centro activo), se encuentran muy próximos a ella. El valor obtenido aquí es algo más pequeño a los obtenidos por otros autores (Matthew & Richards, 1982). Ello es debido al método de cálculo y a las resonancias empleadas para su obtención así como a la diferente fuerza iónica empleada en los experimentos, pues aunque se ha mostrado que la unión del ión Cl⁻ no es muy importante (Tandford & Hauenstein, 1956), la His 12 está muy próxima al sitio de unión aniónica, determinado electrostáticamente.

La His 48 (Fig. II.22), está en la primera lámina, la lámina βI, concretamente en la hebra β₁, y esta implicada en el cambio conformacional más importante que sufre la Ribonucleasa con el pH. Su titulación no puede observarse en los protones aromáticos, pues las señales se ensanchan mucho y desaparecen tanto en los experimentos COSY como en los NOESY. Los efectos de la protonación se han podido observar únicamente en otros protones que están próximos en el espacio al anillo imidazólico, como son los de Ala 19, Ala 20 y Thr 82, el H_β de Thr 17, el H_β de Arg 85 y el NH de Thr 99. El ensanchamiento de las señales también se observa en su propio NH y en el de Ile 81 (en los experimentos COSY, las señales en la región de Phe 46, Val 47, His 48, Ile 81 y Thr 82 de la huella dactilar llegan a desaparecer). Obsérvese, por tanto, que el ensanchamiento se produce sólo en las señales de los NHs, esto es, en los protones cuyos enlaces poseen una elevada polarizabilidad. El valor del pK_a es próximo al intrínseco, como cabe esperar del tautómero más abundante: el N^{δ1}-H (o N^π-H) (Walters & Allerhand, 1980), pero sin embargo difiere considerablemente del calculado teóricamente (Matthew &

Richards, 1982), debido a que en el cálculo no se considera de forma adecuada el entorno electropositivo que rodea al anillo.

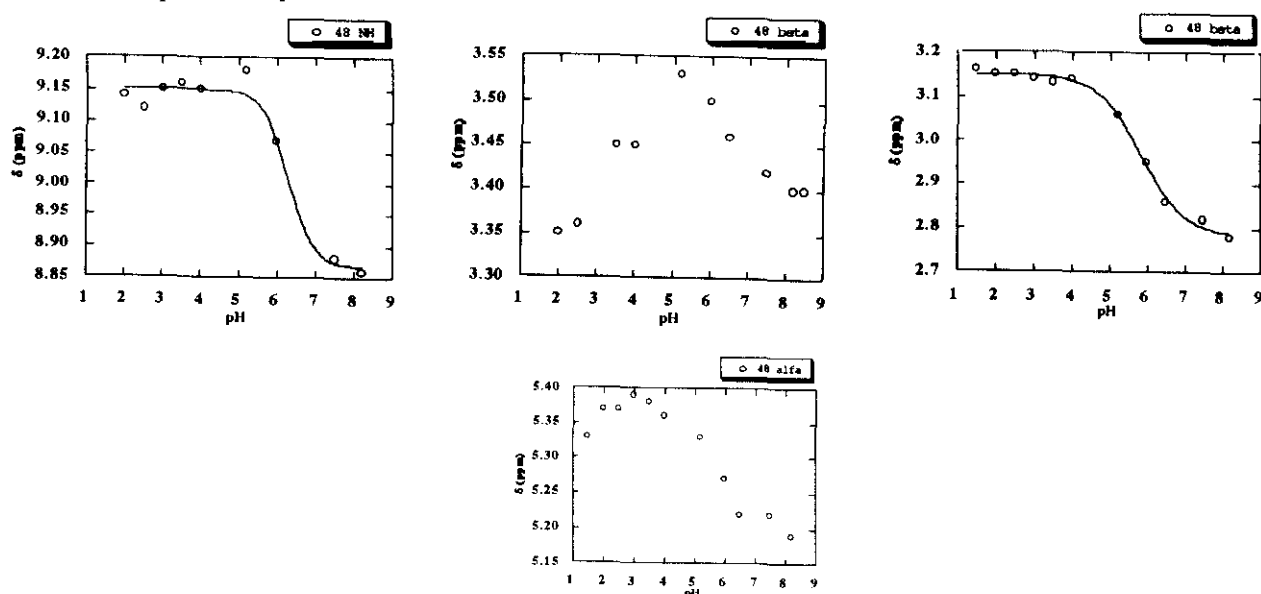


Fig. II.22: Curvas de la titulación de los protones de His 48.

El siguiente residuo histidínico es la His 105 (Fig II.23), que se encuentra al comienzo de β_6 , formando parte de la segunda lámina, β_{II} . Contrariamente a lo que ocurría con los otros dos residuos, es muy fácil obtener el valor del pK_a pues no presenta la influencia de ningún residuo ácido cercano, ni un ensanchamiento de las señales como consecuencia de un cambio conformacional. Es asimismo, el más externo de todos los anillos imidazólicos (Santoro et al., 1993). Para obtener el valor del pK_a del anillo se han utilizado las señales protónicas del propio residuo, las de los H_β de Lys 104 y las del NH y OH(γ) de Ser 75, protones que se encuentran en las proximidades (Fig II.24).

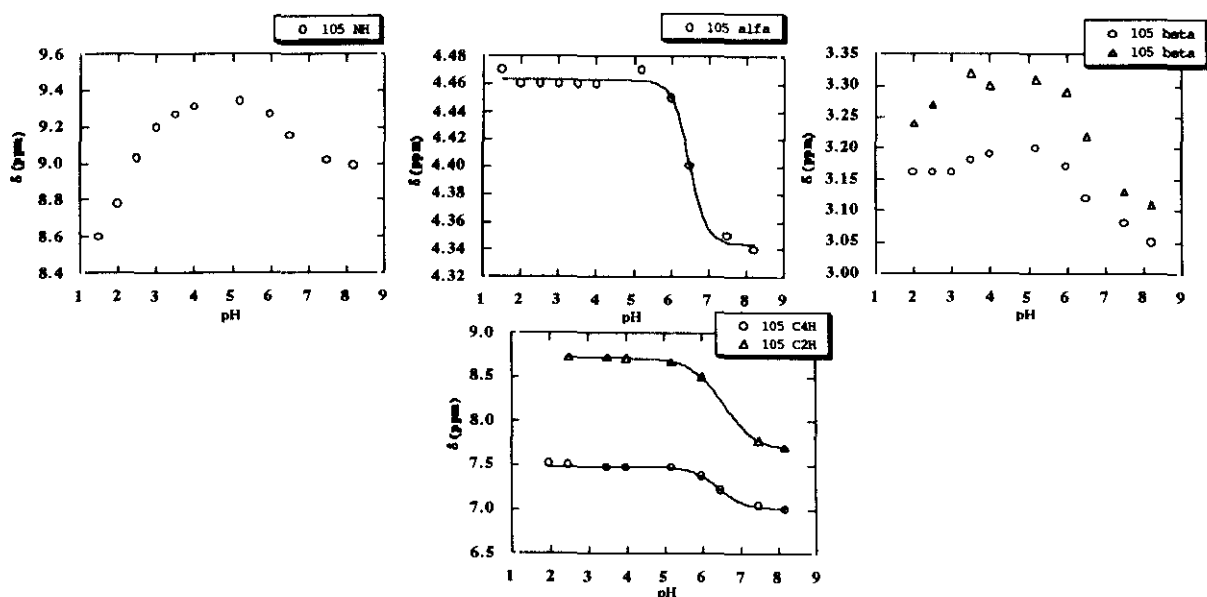


Fig. II.23: Curvas de la titulación de los protones de His 105.

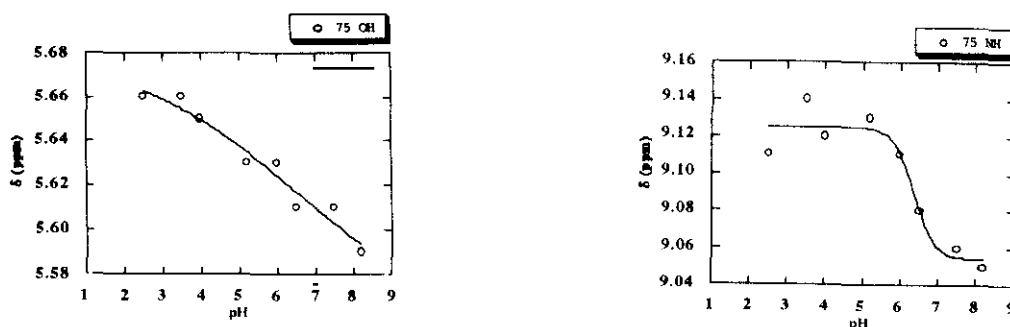


Fig. II.24: Curvas que muestran la titulación de los protones NH y OH(γ) de Ser 75.

La His 105, muestra en su protón peptídico, NH, dos titulaciones, una a pH ácido, que es atribuible al carboxilato del extremo C-terminal y otra al pK_a de su propia cadena lateral. Uno de los protones H_β tiene el mismo comportamiento que el NH, aunque no el otro, que sólo titula con el pK_a de su propio anillo. Esto es un nuevo ejemplo de la estereoespecificidad de los protones que se ve confirmado por la presencia de los NOEs: de los dos protones H_β , el que presenta una señal más intensa con los grupos Metilo(γ) de Val 124, es el que no muestra en su curva de titulación la inflexión a pK_a ácidos, lo cual nos indica que éste está más lejos del grupo carboxilato que el otro. Los demás protones titulan con el pK_a del propio residuo, en transiciones que son cooperativas o normales como las de los dos protones del anillo. El pK_a del anillo concuerda muy bien, dentro del error experimental, con los valores obtenidos por otros autores (Schechter et al., 1972; Matthew & Richards, 1982) y con el valor calculado, lo que nos indica que el modelo de dos estados aplicado es correcto y que el efecto de la disociación de Val 124 sobre el equilibrio de disociación es muy débil. .

La His 105, presenta entre un 50 % a un 90 % del tautómero menos común (Walters & Allerhand, 1980): el $N^{\delta 1}$ -H (N^{π} -H), lo que ha de deberse a la posibilidad de formar un puente de hidrógeno entre el $N^{\delta 1}$ -H con el carbonilo de Ser 75. El conjunto de señales que presenta esta histidina, en los espectros NOESY es incompatible con una única posición fija para el anillo (González, 1991), por lo que se admitió que existía un equilibrio entre dos posiciones que diferían en el ángulo χ_2 . Este equilibrio entre las dos posiciones es la causa de que no exista un único tautómero, pues la estabilización debida al puente con Ser 75, desaparece al girar el ángulo, produciéndose entonces la reordenación de enlaces para pasar al tautómero más estable y compensar así la pérdida del puente de hidrógeno (Fig II.25).

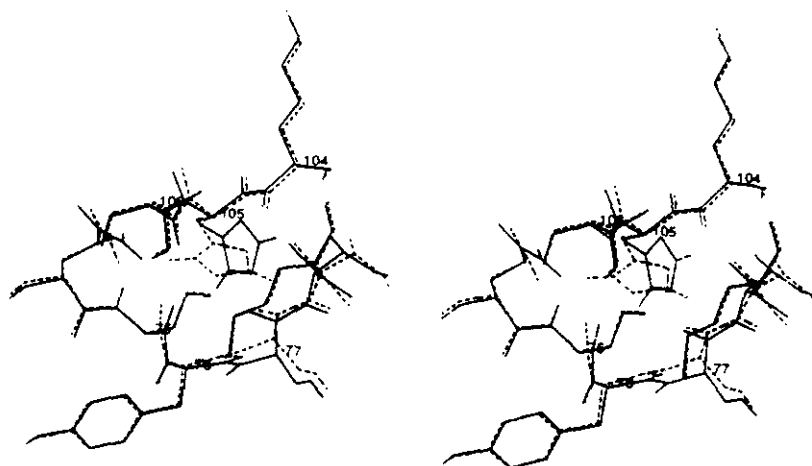


Fig. II.25: Vista estereoscópica de las dos posiciones (en trazo punteado y sólido) del anillo de His 105. Se muestra la superposición de dos estructuras promedio (de González, 1991).

La His 119 (Fig. II.27) es la única histidina que presenta una población dominante del tautómero más común: $\text{N}^{\epsilon 2}\text{-H}$ ($\text{N}^{\epsilon 1}\text{-H}$). Este anillo se encuentra también en el centro activo y participa también en la catálisis de hidrólisis de RNA. Para determinar su pK_a se ha hecho uso de los protones aromáticos de su anillo imidazólico y de sus propios protones H_{β} , los cuales muestran varias inflexiones, correspondientes a los distintos grupos ionizables presentes en el centro activo. También se ha hecho uso de la titulación que muestra uno de los protones H_{β} de Phe 120, del NH de Ala 109 (al cual se encuentra cercano pues es el residuo que se encuentra "enfrente" en la hebra β_6), del protón H_{β} de Val 118 y del NH de Ala 5, que se encuentra muy próximo en el espacio como lo muestran las señales NOE de dicho protón con los Metilos(γ) de Val 118.

Los protones NH y $\text{H}_{\beta 2}$, $\text{H}_{\beta 3}$ de His 119 (Fig II.27) acusan la titulación de Asp 121, aunque en el caso del NH tal transición es anticooperativa (debido a la mayor polarizabilidad del grupo peptídico y a la presencia del fosfato presente en la proteína) y en los otros dos protones es cooperativa. Las transiciones son normales y cooperativas para el NH, el H_{α} y uno de los H_{β} , mientras que el resto presenta titulaciones anticooperativas, indicando que incluso los valores de los pK_a s vienen determinados por la influencia de las varias especies cargadas que confluyen en el centro activo e incluso del anión fosfato sobre el equilibrio de ionización del propio anillo imidazólico. A pesar de ello, el efecto en los protones del anillo. Las curvas de titulación para los protones imidazólicos en la proteína libre del anión (tipo Worthington), muestran la misma inflexión a pHs muy áci-

dos, aunque el protón H_β de His 119, que muestra un comportamiento cooperativo indica, sin lugar a dudas la influencia del anión (y de su segunda constante de acidez, del orden de 7.5) sobre el pK_a del protón H_β .

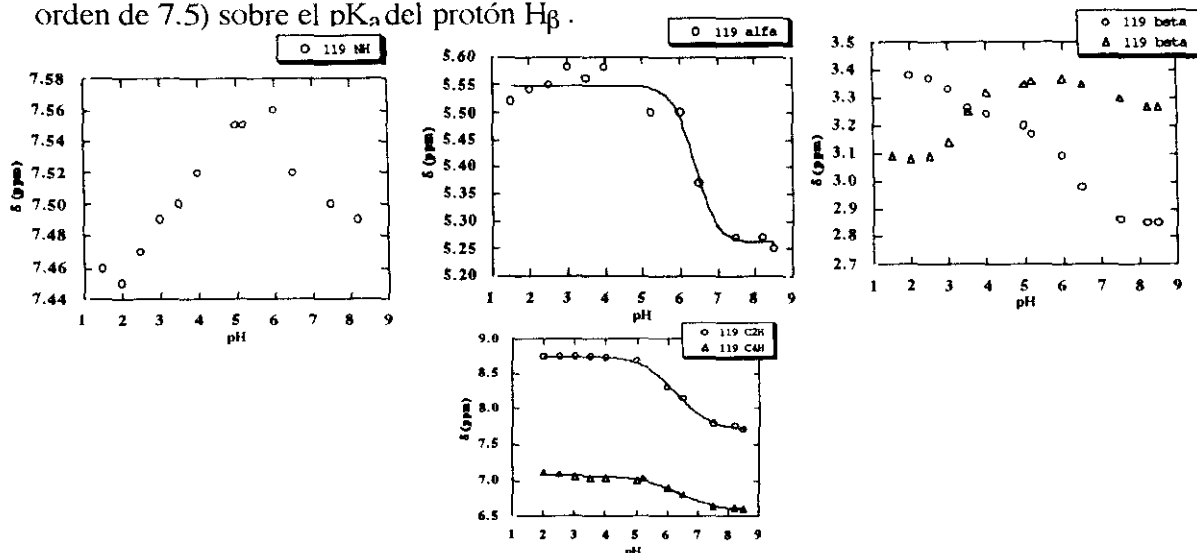


Fig. II.27: Curvas de la titulación de los protones de His 119

Para ninguno de los residuos propiamente básicos (lisinas, tirosinas y argininas), con la excepción de Lys 41, detectada indirectamente en las curvas de titulación de His 12, hemos podido evaluar los valores de los pK_a s correspondientes a sus equilibrios de ionización. A pHs superiores a 8.5 la proteína comienza a desnaturalizarse irreversiblemente a lo largo de los dilatados tiempos del experimento en la espectroscopía de RMN-2D.

2.3.2. CAMBIOS CONFORMACIONALES CON EL pH.

Del estudio de los espectros protónicos de Ribonucleasa A a diferentes pHs podemos concluir de modo general, una vez analizados en detalle los efectos NOE observados a cada pH, que no existe ningún cambio conformacional drástico. La estructura de la Ribonucleasa A, en disolución acuosa determinada a $pH = 4.0$ (González, 1991; Santoro et al., 1993) es fundamentalmente válida en el intervalo de pHs analizado experimentalmente, desde $pH = 2.5$ a $pH = 8.5$.

Podemos, no obstante, hacer mención aparte de los dos únicos cambios observados en todo el rango de pH, uno de los cuales lleva implícitas nuevas señales de NOE (el correspondiente a la primera lámina y que está relacionado con la disociación del anillo imidazólico de His 48) y el otro que comprende el extremo C-terminal, y en el que no se observa ninguna nueva señal de NOE entre los protones implicados aunque sí cambios en los desplazamientos químicos.

El cambio conformacional asociado con la disociación del anillo imidazólico de la His 48.

Sin duda alguna, el cambio conformacional con el pH más importante que ocurre en la Ribonucleasa A tiene lugar en esta lámina y está asociado a la titulación de His 48. Cuando esta Histidina titula las señales de sus protones aromáticos se ensanchan y desaparecen. El ensanchamiento de las señales implicadas durante la titulación de las histidinas se produce en todas ellas, pero sólo en ésta, His 48, llegan a desaparecer las señales correspondientes al H^{ε1} y H^{δ2} (incluso, no aparece también el protón peptídico del propio residuo y los de residuos cercanos de otras hebras). Cuando la titulación ha terminado (alrededor de pH = 7.5), las señales de ambos protones vuelven a aparecer a una frecuencia correspondiente a un residuo imidazólico que ha titulado, presentando, en esencia, el mismo modelo de NOEs que antes de la titulación. De lo dicho, podría deducirse que el entorno de la Histidina no ha sufrido ningún cambio antes y después de la titulación, pero entonces, *¿qué es lo que ocurre durante la titulación?*, si todo es aparentemente igual antes y después, *¿es qué el cambio conformacional sólo tiene lugar en el intervalo correspondiente al estado de transición?*.

El estudio del mismo problema en la Ribonucleasa S mostró que en una estructura similar, la His 48 titulaba normalmente, e incluso si a la proteína nativa se la añadía acetato sódico en concentración 0.2 M, las señales de la Histidina eran perfectamente observables durante su titulación y los desplazamientos químicos observados antes y después de la titulación coincidían con los observados en la proteína en la ausencia del acetato (Cohen et al., 1973). De todo ello parecía deducirse que el entorno de la His 48 no cambiaba sustancialmente al añadirle acetato, y que una pequeña variación en la zona de la digestión con subtilisina parecía afectar sustancialmente los alrededores del anillo imidazólico. A pesar de todo, la cuestión seguía sin resolverse: si todo el entorno era esencialmente el mismo, *¿qué es lo que motivaba el ensanchamiento?*.

Para explicar la desaparición de las señales, se supuso que ocurría un cambio conformacional (Lenstra et al., 1979; Santoro et al., 1979) basado en la interacción de uno de los NH imidazólicos de la His 48 con el grupo carboxilato de Asp 14, a pHs menores que 6.0, contrariamente a lo observado en el cristal en lugar de lo que se observaba cristalográficamente (interacción de éste último con el OH de Tyr 25). La estructura en disolución obtenida a partir de las restricciones de distancia basadas en efectos NOE ponía de manifiesto también la existencia del enlace de hidrógeno de la cadena lateral del Asp 14 con el OH de Tyr 25 a pH = 4.0 (González, 1991), desatándose así el cambio conformacional propuesto.

Por espectroscopía de RMN de ^{13}C (Walters & Allerhand, 1980), en 0.2 M de acetato, se observó que el tautómero predominante en la His 48 es el $\text{N}^\pi\text{-H}$ (o $\text{N}^{\delta 1}\text{-H}$), es decir, el menos común. Entonces se sugirió que la estabilización de esta forma menos común, era consecuencia de la formación de un puente de hidrógeno del protón $\text{H}^{\delta 1}$ con el grupo hidroxilo de Thr 17 o con el carboxilato de Asp 14. Sin embargo, en la estructura en disolución (Santoro et al., 1993) se encontró que el $\text{H}^{\delta 1}$ formaba un puente de hidrógeno con el carbonilo (CO) de Thr 17 y el protón $\text{H}^{\epsilon 2}$ con el OH de Thr 82, es decir, ninguna de las dos sugerencias anteriores respecto a los aceptores de los puentes de hidrógeno era correcta. El valor de pK_a obtenido por nosotros se corresponde muy bien con el del tautómero propuesto sobre la base de datos de ^{13}C . Asimismo, de su bajo valor de pK_a , puede deducirse que el anillo imidazólico se encuentra rodeado de un entorno muy electropositivo (debido a la presencia de Arg 85 y a las dos lisinas que existen en la bolsa). Este valor de pK_a difiere del calculado (Matthew & Richards, 1982), debido a las limitaciones del modelo.

Desde nuestro punto de vista, con el uso de la espectroscopía de RMN bidimensional, podemos abordar el problema no sólo calculando el punto de titulación, sino también desde dos enfoques, íntimamente relacionados:

1.- *¿Cambia, realmente, el entorno de la His 48?*

2.- *¿Qué es lo que ocurre durante la titulación?*

1.- Mediante la espectroscopía 2D, es posible seguir la evolución de las señales de los protones de la bolsa hidrofóbica formada por las tres hebras, β_1 , β_4 y β_5 . Aunque los NOEs de los protones del esqueleto de Tyr 25 (Fig. II.28) con los de otros protones pertenecientes a las láminas son sustancialmente los mismos, se observan pequeños cambios en los desplazamientos químicos de los protones de Tyr 25. No ocurre así con su cadena lateral, la cual presenta señales que varían de intensidad con el pH. Tanto los protones orto como meta del anillo de Tyr 25 presentan señales con el protón H_α de Ala 20 a bajo pH, pero a medida que aumenta el pH la señal con los protones H_ϵ (meta) desaparece, y pierde intensidad la de los protones H_δ (orto). Todo lo contrario ocurre con los protones del grupo Metilo(γ) de Thr 17, el cual a pHs muy básicos presenta una señal muy intensa con los protones meta (que crece durante todo el intervalo de pH), y con el Metilo(β) de Ala 19, el cual presenta una señal nueva con los protones meta de Tyr 25, a partir de $\text{pH} = 7.5$, justamente después de haber titulado el protón imidazólico. Por tanto, parece como que el anillo aromático de la Tyr 25 se moviera, o bien que el segmento entre las hélices I y II (región Asp 14-Ser 23) se desplazara de su

posición original. La primera opción es la menos probable, debido a que la intensidad de las señales NOE del anillo fenólico con otros anillos (tanto con la Phe 46 como la His 48) se mantiene, por lo que hay que admitir que durante y/o después de la titulación la región flexible entre la hélices es la que readapta su conformación. Existe otra evidencia para apoyar la propuesta de que es la región Asp 14-Ser 23 la que se reordena, si bien es menos rotunda que la anterior, debido a que se basa en las señales presentes en una zona en la que existe un gran solapamiento de señales: a pH = 2.5, el protón H_α de Ala 19 muestra señales con los protones H_γ de Gln 101, señales que no se observan a pH = 8.2.

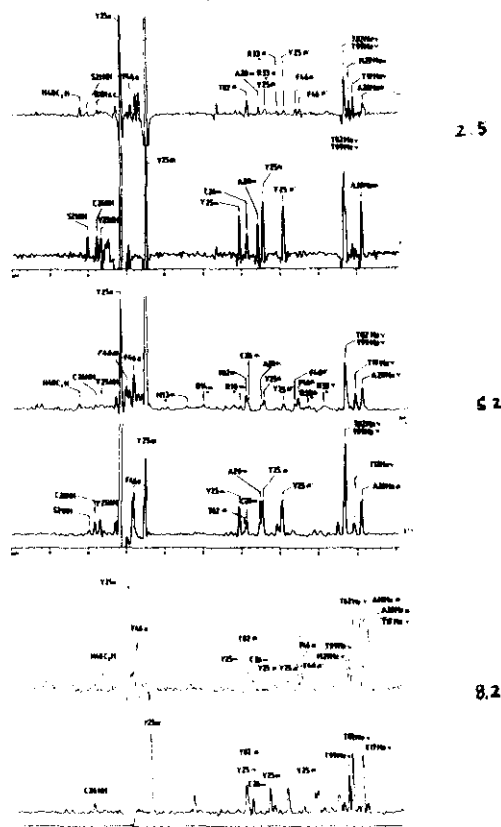


Fig. II.28: Filas correspondientes a experimentos NOESY a la frecuencia de los protones H_δ y H_ϵ de Tyr 25 a diferentes pHs.

2.- Para responder a la segunda pregunta, tenemos que estudiar las características espectrales de los protones de la His 48 antes, durante y después de la titulación. La señal de NOE a larga distancia más característica del anillo imidazólico es la señal del protón $H^{\delta 2}$ con el protón H_α de Ile 81 (Fig. II.29 a), que aparece tanto a pHs ácidos como básicos. A pHs por debajo de la titulación del anillo resulta muy difícil observar las señales del anillo imidazólico con la suficiente precisión debido al solapamiento con otros protones aromáticos. Observando los pHs por encima del pH de titulación, las señales son las mismas, únicamente se encuentra que la señal del protón H_α de Ala 19, con ambos protones imidazólicos es mucho más intenso,

que el observado a bajos pHs. Este resultado confirma la suposición anterior de que es la hebra que comprende los residuos Asp 14-Ser 23 la que se reordena su conformación. Para saber qué ocurre durante la titulación, se preparó una muestra en D₂O a pH = 6.0, con 0.05 M de trifluoroacético deuterado, el cual es análogo al acético en volumen y en comportamiento (Fig II.29 b). Los resultados mostraron que durante la titulación no había variación en intensidad de las señales observadas de la His 48 (sobre todo del NOE característico del protón H^{δ2} del anillo con el H_α de la Ile 81, aunque aparecía muy ancho), con lo que eso confirma que durante la misma no se produce ningún cambio conformacional brusco (incluso para ninguna otra región de la proteína como se confirmó comparando el resto de los NOEs que presentaban los otros residuos aromáticos en el medio de trifluoroacético). El protón H^{ε1} del anillo no se observó, debido a la baja concentración del ácido.

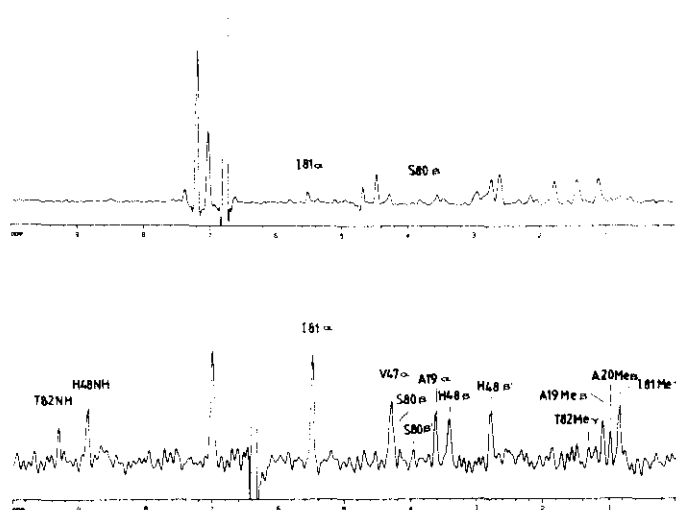


Fig II.29: Filas de experimentos NOESY correspondiente a la frecuencia del protón H^{δ2} de His 48 en: a) pH = 8.2; b) pH = 6.0 en 0.05 M de trifluoroacético.

Con todo este conjunto de datos experimentales, se puede intentar dar una explicación al ensanchamiento de las señales: cuando el anillo imidazólico comienza a disociarse, uno de los puentes de hidrógeno que sus dos NH aromáticos, forman superiormente con dos partes diferentes de la estructura se rompe, y esto supone una pérdida del orden de 1.5 Kcal mol⁻¹ (Serrano & Fersht, 1989; Matouscheck et al., 1990) para la estabilidad de la proteína, sin contabilizar la creación del "hueco" que en este caso puede originar la pérdida del protón (Tandford, 1962) en una región tan hidrofóbica. El ion OH⁻ encontrará muy difícil el acceso a cualquiera de los dos protones del anillo, implicados ambos en enlaces de hidrógeno constituyentes de la estructura tridimensional de la proteína, por lo que este "ataque" lento será el causante del ensanchamiento y desaparición de las señales (intercambio lento en la escala de RMN).

La explicación podría concluir aquí, si no se dispusiera de más datos, pero existen aún algunas señales NOE que explicar. La estructura nativa de la proteína no puede perder tal cantidad de energía, por lo que, para compensarlo, tenderá a "enterrar" superficie hidrofóbica o "formar" otro puente de hidrógeno. Por los NOEs observados, parece que la proteína "prefiere" la primera opción, pues mientras está titulando, la hebra que compone el giro entre las hélices, residuos Asp 14-Ser 23, se desplaza hacia la His 48 acercándose el grupo Metilo(β) de la Ala 19 hacia el protón $H^{\delta 2}$ y el $N^{\epsilon 2}$, lo cual motiva el enterramiento de un grupo metilo con un incremento energético del orden de 1.0 a 1.3 Kcal mol⁻¹ (Kellis et al., 1988; Kellis et al., 1989; Eriksson et al., 1992), que prácticamente compensa la pérdida anterior, y "tapa" el hueco creado entre las hebras por la pérdida del protón (esto explicaría el aumento de intensidad de las señales con el protón H_{α} de Ala 19, y con el protón meta de Tyr 25, el cual está muy cerca del anillo imidazólico, y se ve ligeramente empujado por la presencia de la cadena lateral). El desplazamiento de la hebra no es muy grande, pues a pHs después de la titulación del anillo se siguen observando los NOEs de los protones H_{β} de la Ser 18 con los protones H_{β} de His 48.

El hecho de que el equilibrio de ionización del grupo imidazólico de His 48, en la Ribonucleasa S sea un proceso de intercambio rápido en la escala de tiempos de RMN, implica que el OH⁻ no tiene ninguna dificultad en acceder a las posiciones de los dos protones del anillo imidazólico, tanto por la ruptura del enlace peptídico Ala 20-Ser 21, que permite una mayor accesibilidad del disolvente a la primera lámina, como porque no exista alguno de los enlaces de hidrógeno en este caso. El hecho de que en las estructuras recientes obtenidas por difracción de Rayos X (Kim et al., 1992; Varadarajan & Richards, 1992), la influencia de los últimos residuos del S-péptido no sean importantes para la estructura global de las Ribonucleasa S, nos hace pensar que con toda seguridad que el enlace de hidrógeno que no existe es el que se produce entre el CO de Thr 17 con el $H^{\delta 1}$ de His 48; mientras que se mantendría el que existe entre el otro protón imidazólico y el OH de Thr 82.

La acción del acetato (o trifluoroacético), sólo puede explicarse considerando que actúa como catalizador del equilibrio de ionización, rebajando la energía de activación del estado intermedio y facilitando la transferencia o absorción, en su caso, del protón correspondiente.

El cambio conformacional asociado con el extremo C-terminal.

A diferencia del anterior, este cambio conformacional, no implica la presencia de nuevas señales NOEs antes y después del mismo, sino que ha sido detectado como

consecuencia de los cambios en los diferentes desplazamientos químicos que se muestran en algunos protones.

La Ser 123 (Fig II.30), está muy próxima a la hebra β_5 como lo muestran los NOEs con los protones de Lys 104, y a la primera lámina (señales con el Metilo(γ) de la Ile 81). La intensidad de los NOEs con la Lys 104 aumenta a partir de pH = 6.0. Hasta ese pH, los protones de Ser 123 aparecen, al igual que los Metilos(γ) de la Val 124, degenerados. Sin embargo, a partir de aquí presentan diferente desplazamiento químico (Fig. II.30 c). Este cambio se debe a la disociación del anillo imidazólico de His 105, y a su interacción con el carboxilo terminal. Como se ha comentado, la His 105 presenta dos conformaciones que se diferencian en posiciones alternativas del ángulo χ_2 . Es posible que se produzca un desplazamiento de la población hacia una de ellas aunque no de un modo total, debido a que siguen apareciendo los NOEs alternativos del anillo aromático de His 105 con los Metilos(γ) de Val 124.

Recientemente se ha demostrado que en algunas proteínas, el cambio en el estado de ionización de los extremos terminales (Kohda et al., 1991) afecta a regiones muy alejadas de los mismos. En la Ribonucleasa A, sin embargo, no es la disociación del carboxilo terminal el origen del ligero cambio observado, sino que dicho cambio es consecuencia de la pérdida de la interacción electrostática entre el anillo imidazólico y el carboxilato terminal.

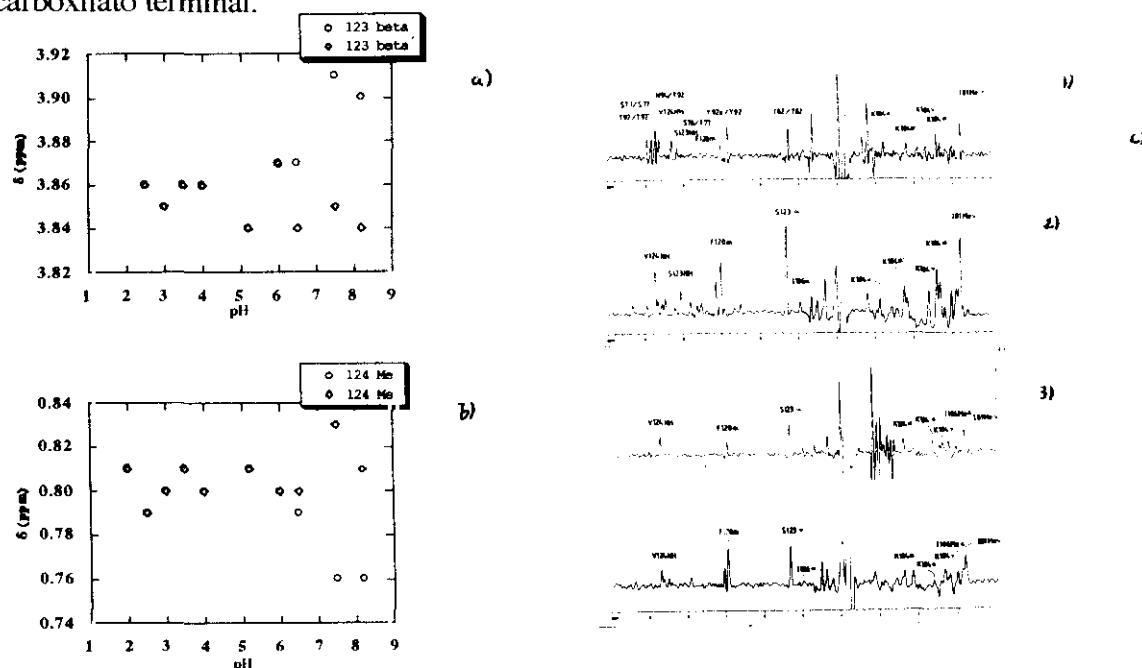


Fig II.30: a) Curvas que muestran la titulación de los protones β de Ser 123; b) Filas de experimentos NOESY correspondientes a la frecuencia del protón o los protones β de Ser 123 a : 1) pH = 2.5; 2) pH = 5.2; 3) pH = 8.2. c) Curvas que muestran la titulación de los protones de los grupos metilo de Val 124.

2.3.3. INTERACCIONES IÓNICAS EN RIBONUCLEASA A.

El estudio de las curvas de titulación correspondientes a distintos protones de la enzima ha permitido descubrir importantes interacciones que estabilizan la estructura terciaria de la proteína, las cuales se discuten a continuación. Hay que decir que estas interacciones provocan grandes cambios en los desplazamientos químicos de las resonancias correspondientes a los NHs implicados en dichas interacciones (véase Tabla II.1). Concretamente el valor encontrado para el protón NH_ϵ de Arg 10, es el más grande, aunque la resonancia desaparece en el extremo básico, el valor de $\Delta\delta$, se pudo determinar al imponer la restricción de que el valor de su punto de inflexión habría de coincidir con el del pK_a de Glu 2. Para el NH de la His 105, el proceso de convergencia no discurría adecuadamente con lo que no fue posible obtener el desplazamiento químico de la porción ácida y por tanto calcular el cambio en el mismo debido a su interacción con el carboxilato terminal de Val 124. Es para el de la Lys 66, donde se produce el mayor cambio en el $\Delta\delta$ efectivo al conocerse perfectamente tanto la parte ácida como la básica de la titulación. En todos los casos el protón del residuo que actúa como donador del puente de hidrógeno (o puente salino) experimenta un cambio en el desplazamiento químico a campo bajo, es decir a δ mayores, consecuencia de que la formación del puente de hidrógeno desapantalla a los hidrógenos, al "retirarle" parte de la carga de su esfera electrónica. Prácticamente en ningún caso se observan señales NOE entre los diferentes protones de los residuos implicados, posiblemente debido al hecho de la movilidad de las cadenas laterales.

El puente salino Glu 2-Arg 10.

La evidencia experimental que sustenta la evidencia de este puente radica principalmente en la fuerte titulación que presentan el NH_ϵ y el protón H_δ de Arg 10, pues no existen señales NOE entre ambos residuos (Fig. II.31). Junto con esta evidencia, se observa también, tal como se ha descrito en el apartado 2.3.1. la influencia de la titulación de Glu 2 sobre protones concretos de Gln 11 e His 12.

Una confirmación adicional de la presencia de este puente, además de la gran titulación que experimenta el protón de NH_ϵ de Arg 10 (observada por otros autores también para péptidos modelo; Fairman et al., 1990), es la diferencia en desplazamiento químico de los protones $\text{H}_{\delta 2}$ y $\text{H}_{\delta 3}$ de su cadena lateral, que señalan un entorno químico muy diferente para ambos, como cabría esperar para una conformación bien definida de la misma. Esta interacción no es tan fuerte como los puentes de hidrógeno convencionales entre grupos del esqueleto de la hélice, como lo demuestra el hecho de que el NH_ϵ , desaparece como consecuencia del intercambio con el disolvente a $\text{pH} > 6.5$.

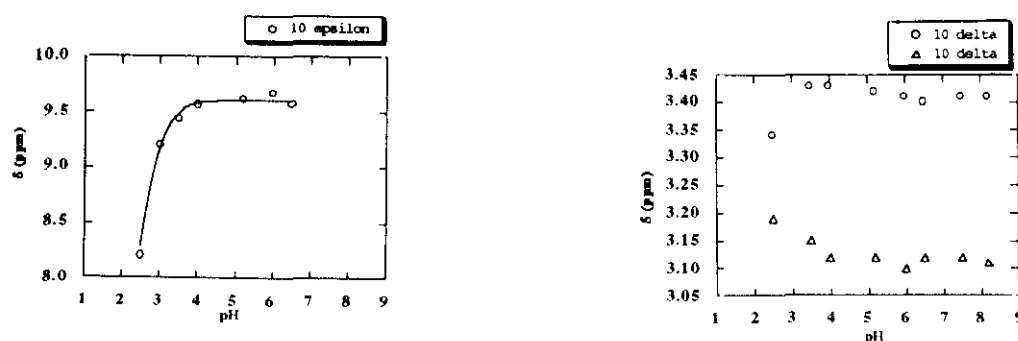


Fig II.31: Curvas que muestran la titulación del NH_ϵ y H_δ de Arg 10.

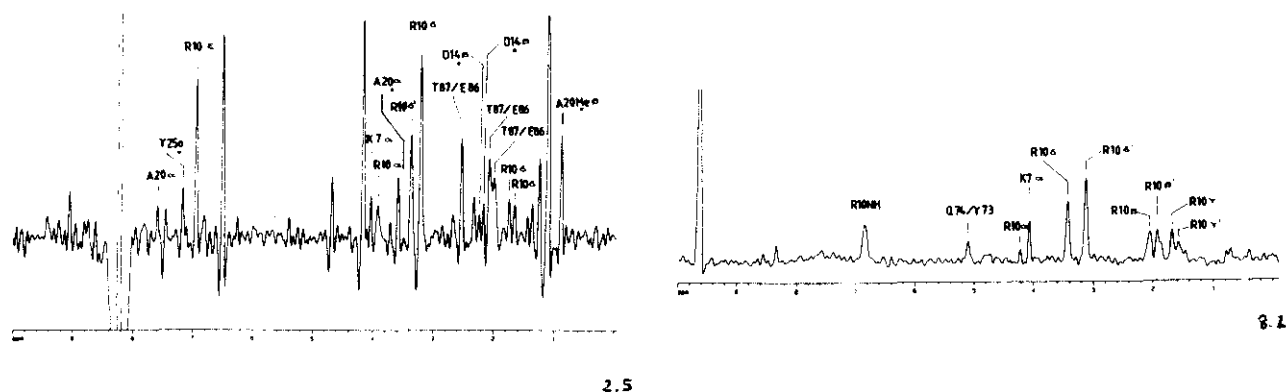


Fig II.32: Filas de experimentos NOESY correspondientes a la frecuencia del protón NH_ϵ de Arg 10 a diferentes pHs.

Este puente salino es una de las causas fundamentales que contribuyen a la estabilidad de la hélice del S-péptido (Rico et al., 1984) y que motiva que esta hélice se constituya en una unidad autónoma de plegamiento. Los NOEs esperados entre ambos residuos serían muy difíciles de detectar, pues se darían en una zona del espectro 2D muy congestionada de señales. En las estructuras calculadas con base en los efectos NOE para la Ribonucleasa A en disolución acuosa este puente salino aparece sólo en un porcentaje relativamente bajo el puente salino que se observa sólo en Rayos X, no es encontrado más que en algunas es-structuras en disolución (Santoro et al., 1993).

A partir de $\text{pH} = 5.2$, la hélice del S-péptido comienza a presentar NOEs de tipo giro β muy cercano al pH en el que se intercambia el protón del puente salino, lo cual confirma la importancia dada al mismo en la estabilidad de la estructura helicoidal del S-péptido (Rico et al., 1984; Fairman et al., 1990); los protones NH_η , también implicados por un puente con Glu 2, desaparecen al mismo pH, aunque su intercambio es más

rápido que el del NH_ϵ , como se manifiesta en la anchura de la señal del NOE entre ambos y a la carencia de otras señales diferentes con los NH_η a diferencia de NH_ϵ , el cual presenta señales con toda su cadena lateral; el único NOE de los NH_η se produce al $\text{pH} = 2.5$ con el protón H_α de Lys 7, lo cual parece indicar la presencia de algún tipo de estabilización a bajo pH : posiblemente un puente de hidrógeno entre el grupo carboxilo de Glu 2 y el NH_ϵ de Arg 10.

Los puentes de hidrógeno Ser 80 (NH)-Glu 49 (COO^-) y Ser 50 (NH)-Asp 53 (COO^-).

La existencia de un puente de hidrógeno entre el carboxilato de Glu 49 y el NH de Ser 80 (Fig.II.33 a) se fundamenta claramente en la titulación que sufre este último protón entre el rango $\text{pH} = 3.0$ y $\text{pH} = 6.0$. En las proximidades del NH de Ser 80, no existe en la estructura en disolución otro grupo que titule con un pK_a cercano más que Glu 49. La contribución de este puente de hidrógeno a la estabilidad de la proteína es importante pues fija las hebras β_1 y β_4 de la lámina βI , justo en el límite en que acaba la estructura de ésta.

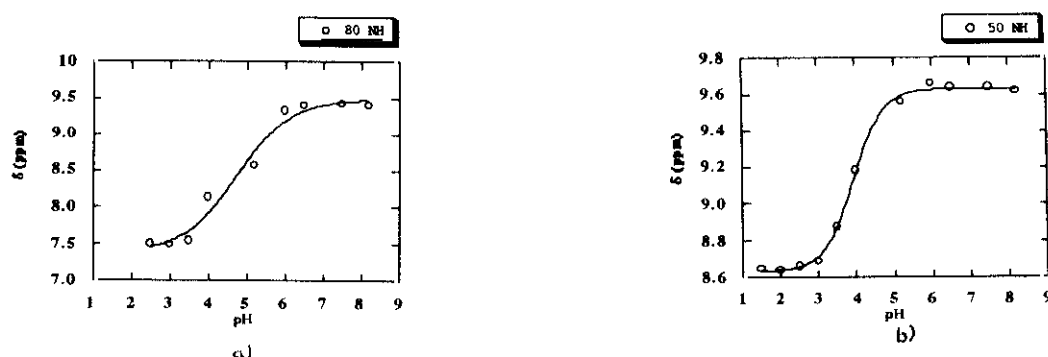


Fig. II.33: a) Curva que muestra la titulación del protón NH de Ser 80. b) Curva que muestra la titulación del protón NH de Ser 50.

El puente de hidrógeno entre el NH de la Ser 50 y el carboxilato de Asp 53 (Fig.II.33 b), contribuye ciertamente a mantener la estabilidad de la hélice. Este puente de hidrógeno presenta una diferencia sustancial con los dos anteriormente descritos: aparte de la ostensible titulación que presenta el NH de Ser 50 (comparable al que sufren los protones anteriormente expuestos) se observan señales de NOE entre el NH de Ser 50 y los protones H_β de Asp 53, que aparecen a $\text{pH} = 2.5$; además, a $\text{pH} = 3.5$ se puede observar la señal NOE del protón hidroxílico de Ser 50 con uno de los protones H_β del

residuo ácido. A pHs más altos el protón hidroxílico desaparece como consecuencia del intercambio. Con todo ello, es posible asegurar que a pHs ácidos existe algún tipo de interacción entre ambos residuos aún antes de que se produzca la disociación del grupo carboxilo.

Aparte de ello, esta es la única interacción de todas las observadas que tiene lugar entre residuos cercanos en la estructura primaria. Si las demás sirven para "anclar" residuos de la estructura terciaria, ésta fija residuos a corto alcance de la estructura secundaria, concretamente de la hélice II.

Debido a la presencia cercana de Glu 49 es muy difícil asegurar que otros residuos, aparte de Ser 50, "sienten" la desprotonación de Asp 53.

El puente de hidrógeno Lys 66 (NH)-Asp 121 (COO⁻).

Es quizás el más importante de todos los puentes descritos en este apartado; se produce entre el protón NH de Lys 66 y el carboxilato de Asp 121 (Fig. II.34). No existen señales NOE entre ambos residuos por lo que la única evidencia es la fuerte titulación que sufre el protón peptídico de Lys 66, y de todos los residuos implicados en el primer giro β de la proteína con transiciones "normales" (Fig. II.35).

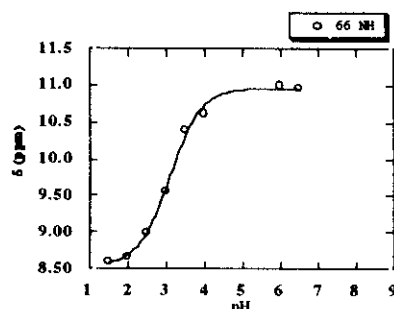


Fig. II.34: Curva que muestra la titulación del protón NH de Lys 66.

Este puente de hidrógeno ha de contribuir sin duda muy efectivamente a mantener la estructura terciaria de la proteína. Desde los primeros estudios del plegamiento en Ribonucleasa A, es conocida la susceptibilidad del enzima en lo que se refiere a su estabilidad, a modificaciones químicas o supresión de residuos en su extremo C-terminal (Andria & Taniuchi, 1978). Incluso el intercambio de hidrógeno que se observa en la porción de Ribonucleasa A (1-118) es mucho más rápido que el observado en la nativa (Roy et al., 1986). La proteína parece recuperar su estabilidad, cuando se le añade el fragmento 105-124. Todo ello parece indicar que el plegamiento de Ribonucleasa A

requiere la presencia del extremo terminal completo y en el que el puente de hidrógeno aquí descrito juega un papel esencial.

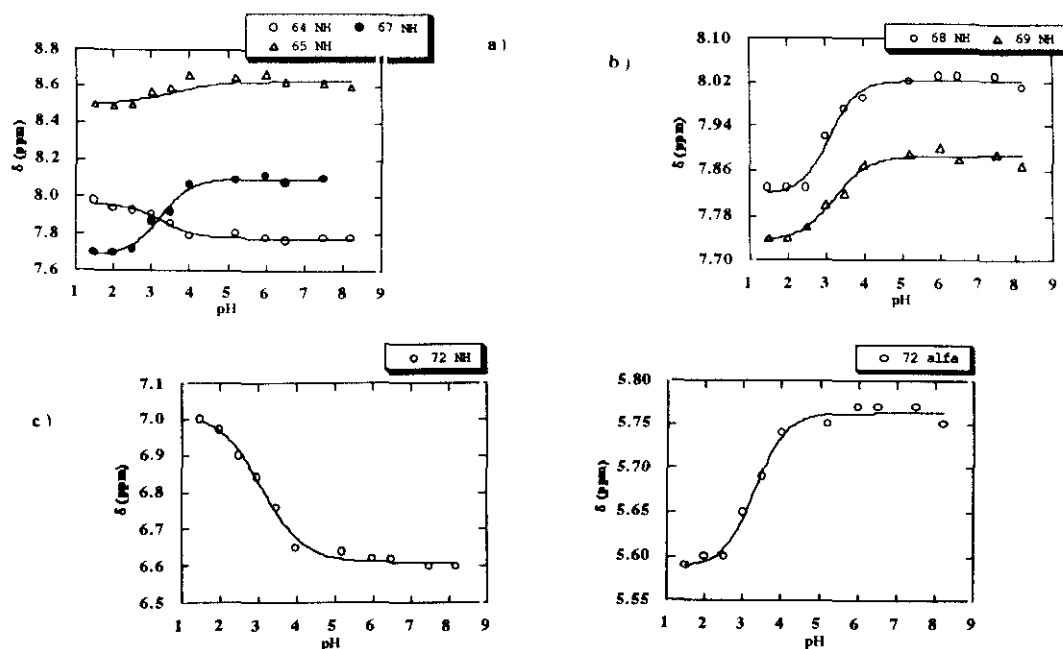


Fig. II.35: a) Curvas que muestra la titulación de los protones NHs de Ala 64, Cys 65 y Asn 67 b) Curvas que muestran la titulación de los protones NHs de Gly 68 y Gln 69. c) Curvas que muestran la titulación de los protones NH y H α de Cys 72.

El puente de hidrógeno His 105 (NH)-Val 124 (COO⁻).

Queda claramente evidenciado por la titulación observada en el Nh de His 105 a pHs bajos. Tanto el NH como el H α de His 105, presentan una titulación a pHs muy ácidos coincidente con el pK $_a$ del carboxilato C-terminal. El protón H α de Val 124, muestra, sin embargo, una titulación correspondiente a la del anillo de Histidina.

También aquí se observan señales NOE entre ambos residuos, tanto entre los del esqueleto (los protones peptídicos entre sí) como entre los de las cadenas laterales (el H δ^2 de His 105 con los Metilos(γ) de Val 124) y de las cadenas laterales con el esqueleto, las cuales no presentan variación de intensidad con el pH. Por tanto es posible que a pHs muy ácidos se mantenga el puente de hidrógeno entre el NH y el carboxilato.

La causa de que el fragmento de Ribonucleasa A (1-120) no se pliegue adecuadamente, se ha adscrito principalmente a la imposibilidad de formar el puente de hidrógeno descrito en el apartado anterior. No se puede, sin embargo, descartar el hecho de que este puente, que contribuye también a fijar las hebras de la última lámina, puede jugar un papel importante en la estabilidad de la proteína.

2.3.4. EL CENTRO ACTIVO.

La estructura en disolución de Ribonucleasa A (Rico et al., 1991; Santoro et al., 1993), muestra que en el centro activo de la enzima o en sus proximidades se encuentran los residuos Phe 8, His 12, Lys 41, Val 43, Asn 44, Thr 45, His 119, Phe 120, Asp 121 y Ser 123. Existe en este centro una abundancia de residuos con carga positiva, lo que es lógico pues en este centro ha de fijarse el sustrato ARN y concretamente sus grupos fosfato, cargados negativamente (Matthew & Richards, 1982).

Todos y cada uno de los residuos sienten los equilibrios de ionización de los otros grupos. Como ya se ha descrito, la His 12, la His 119 y Asp 121, se influyen mutuamente y en las curvas de titulación de sus protones es posible detectar la presencia de los demás grupos.

La Phe 8, junto con la His 12, se encuentra en la primera hélice. El NH y uno de sus protones H_β , del residuo Phe 8, acusa la titulación característica del Asp 121, aunque posiblemente influida por la presencia del Glu 9. Su protón H_α presenta, en cambio, dos titulaciones, una la del Asp 121 y otra la del anillo aromático de His 119. Ninguno de los protones aromáticos del propio anillo se ve afectado por ninguna titulación.

La Lys 41 (Fig. II.36 c), está situada en el gran giro que une la segunda hélice con la hebra β_1 . Su protón NH decae continuamente, con lo que es imposible establecer un punto de titulación. Uno de cada uno de los protones H_δ y H_ϵ titulan con un pK_a que es adscribible a la His 12, acusándose de nuevo, efectos específicos de la orientación de la carga respecto a los CH afectados.

La Val 43, Asn 44 y Thr 45 pertenecen a la hebra β_1 , que forma parte de la lámina β_I antiparalela. En la Val 43 (Fig II.36 a), su NH titula con un pK_a que, por el valor obtenido, pudiera corresponder a la cadena lateral de Glu 9 (con un índice de Hill muy cooperativo). Su protón H_α , cuyo desplazamiento químico decae continuamente, como lo hacía el protón NH de Lys 41 puede sin embargo ajustarse a un equilibrio de ionización con un modelo como el planteado, con un valor de $pK_a = 3.26$, que es muy cercano al del Asp 121, a quien podemos adscribir las titulaciones de tanto el NH como el H_α de Val 43.

En la Asn 44 (Fig II.36 b), su NH titula con un pK_a análogo al del NH de Val 43, pero su protón H_α presenta un comportamiento complejo, resultado de dos posibles interacciones: una la del Glu 86 (y/o los del centro activo, con un valor muy similar al obtenido para Val 43) y otra alrededor de $pH = 6.0$, demasiado pequeña para poder determinarse con alguna garantía ($\Delta\delta \leq 0.05$ ppm). En cambio, uno de los protones H_β

muestra únicamente esta titulación alrededor de 6.0, perfectamente determinable, y que puede atribuirse a la titulación del anillo de His 119, mientras que el otro (subrayando, nuevamente, la importancia de la orientación de cargas y enlaces) no varía con el pH.

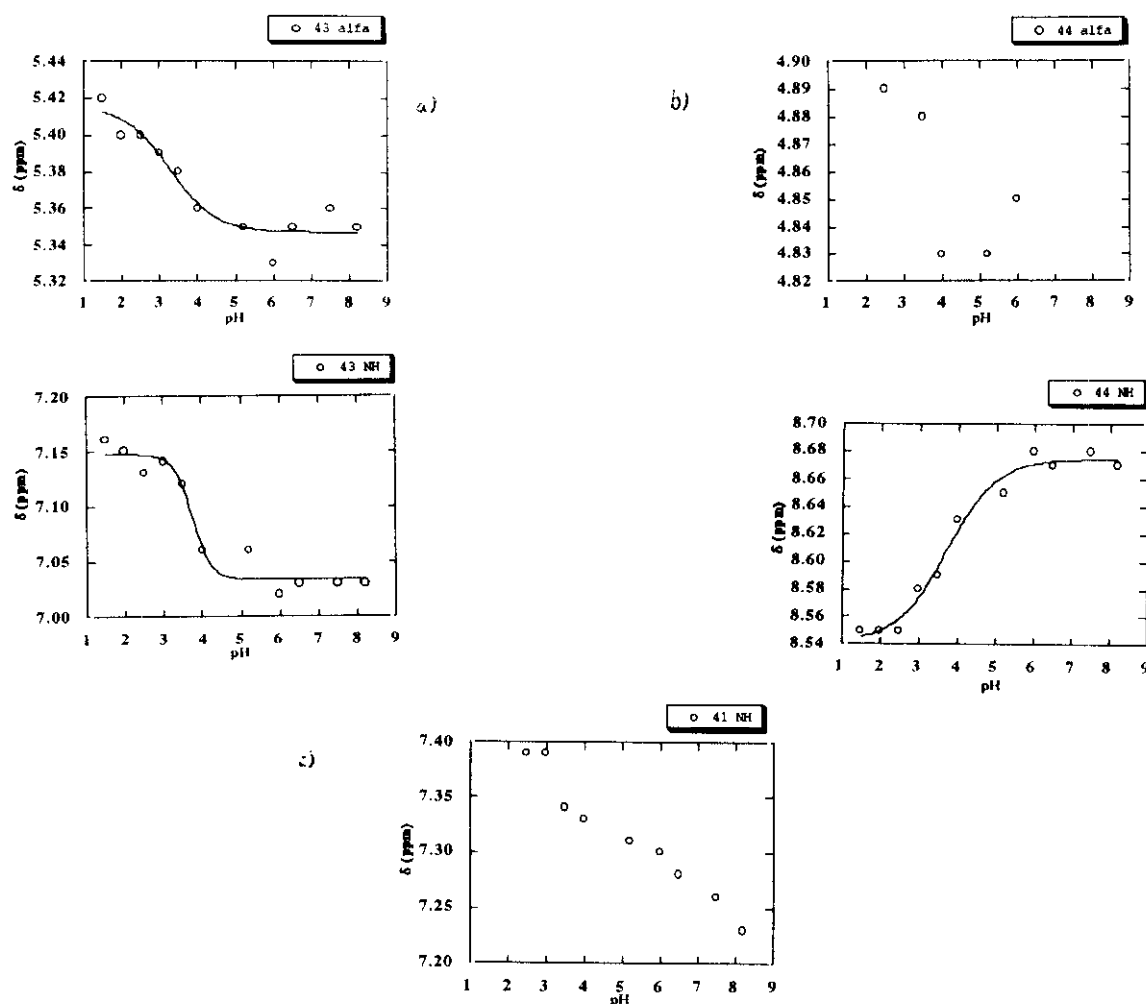


Fig II.36: a) Curvas que muestran la titulación de los protones H_α y NH de Val 43; b) Curvas que muestran la titulación de los protones H_α y NH de Asn 44; c) Curvas que muestran la titulación de los protones NH de Lys 41.

En la Thr 45 (Fig. II.37), el NH titula con un pK_a de 5.6, con una transición fuertemente anticooperativa (del orden de 2.2), que puede ser atribuible a la His 12, consecuencia lógica del puente de hidrógeno, que se forma entre ambos residuos (Santoro et al., 1993). El desplazamiento químico de su protón H_α se desplaza a campos bajos continuamente a pHs muy ácidos, en forma similar a como lo hacía el protón imidazólico de His 12 (y por tanto, atribuible a la presencia de los distintos grupos ácidos que se encuentran en el centro activo) presentando (si se intenta ajustar al modelo propuesto) una titulación cooperativa a $pH = 6.18$, que puede ser debida a la His 12 o a la His 119. El desplazamiento químico del protón H_β , se desplaza a campos bajos. Este protón está

extraordinariamente apantallado debido al efecto de corriente del anillo de del grupo fenilo de Phe 120. Interpretamos la variación en el desplazamiento químico de H_β e incluso del NH de Thr 45, como una ligera reorganización conformacional de dicho anillo provocado por la titulación de Asp 121.

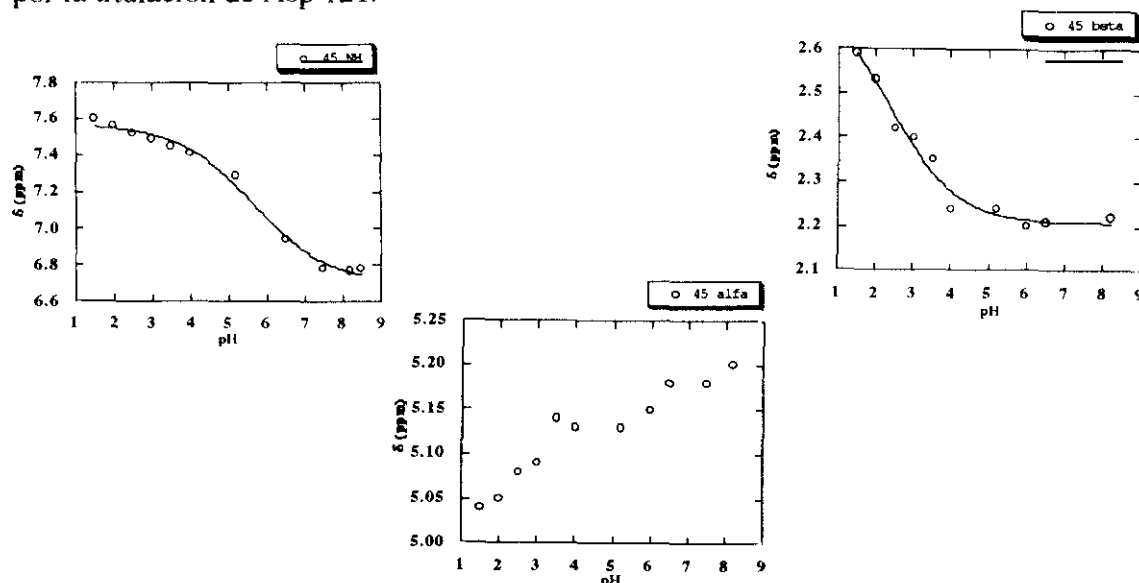


Fig II.37: Curvas que muestran la titulación de los protones H_α , H_β y NH de Thr 45.

La Phe 120, junto con la His 119, Asp 121 y Ser 123 pertenecen a la hebra β_7 de la segunda lámina. La Phe 120 (Fig. II.38), acusa todos los pK_a s de los grupos presentes en la zona en que se encuentra situada: su NH acusa la ionización de Asp 121 con una transición cooperativa, al igual que el protón orto del anillo; su protón H_α , uno de sus H_β , y los protones meta, $H_{\epsilon 1}$ y $H_{\epsilon 2}$, presentan la titulación característica del anillo imidazólico próximo; el mismo protón H_α y los aromáticos presentan la titulación a pHs ácidos (debida a Asp 121, Val 124 o a la interacción de ambos), y por último, el otro protón H_β (otro caso, en el que la diferente orientación de la cadena nos señala su estereoespecificidad) y el para, H_ζ , (si se intenta ajustar) presentan una inflexión muy cercana al primer pK_a del fosfato, aunque será el resultado de la influencia de varios residuos. Para el protón H_ζ la situación es especialmente delicada, debido al solapamiento que se produce en la mayoría de los pHs con los protones H_ϵ .

Prácticamente todo el conjunto de NOEs que constituyó la base para determinar la estructura del centro activo en disolución a pH = 4.0 se mantienen en todo el rango de pHs estudiado, con la importante excepción de las señales NOE correspondientes al protón $H^{\delta 2}$ de la His 119.

Como ya se ha comentado, según los datos de espectroscopía de ^{13}C (Walters & Allerhand, 1980), la His 119 es la única de las Histidinas que presenta el tautómero más

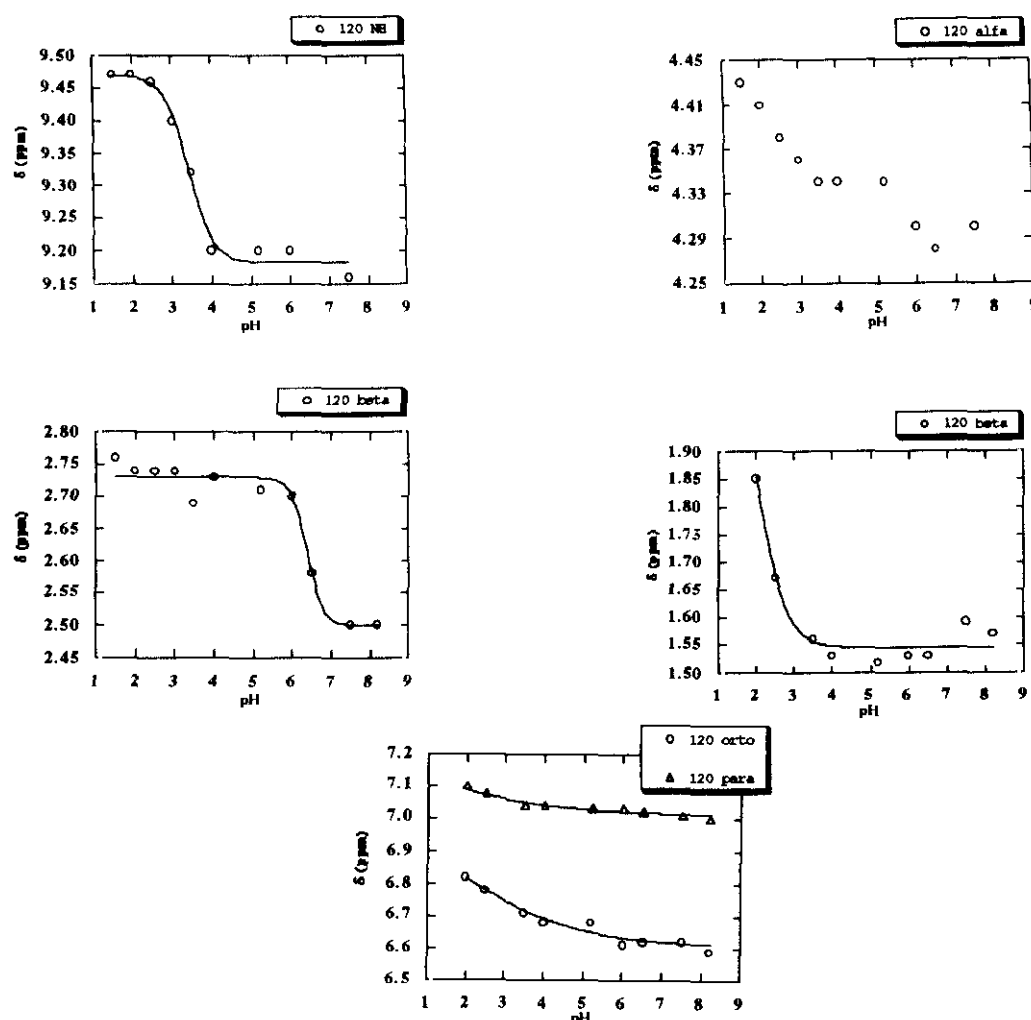


Fig II.38: Curvas que muestran la titulación de los protones de Phe 120.

común: el $N^{\epsilon 2}$ -H (o el N^{ϵ} -H), debido a la formación, según sugieren dichos autores, de un puente de hidrógeno con el carboxilato de Asp 121, que también se encuentra en la estructura en disolución (Rico et al., 1991; Santoro et al., 1993). Sin embargo, al igual que ocurría con la His 105, existen NOEs del protón $H^{\delta 2}$ que no pueden explicarse con una única estructura. El hecho de que dicho protón presente señales con los Metilos(γ) de la Val 118, y a la vez con los protones $H_{\beta 2}$ y $H_{\beta 3}$ del Asp 121, es totalmente incompatible. Hay que concluir, por tanto que se está observando un equilibrio entre dos posiciones diferentes de la cadena lateral que difieren en los ángulos χ_1 y χ_2 , hecho ya observado en la estructura del cristal (Borkakoti et al., 1982; Wlodaver & Sjölin, 1983). La posición relativa de ambas posiciones varía con el pH, según se deduce de la comparación de la intensidad de las señales NOE con los protones H_{β} de Asp 121 frente a la de los Metilos(γ) de Val 118. A medida que se basicifica el medio, se incrementa la intensidad de las señales con los protones H_{β} de Asp 121, que a pHs muy ácidos es muy pequeña (Fig II.39), a la vez que disminuye la intensidad de las señales NOE de los Metilos(γ) de Val 118. Es únicamente cuando el anillo está dirigido hacia el residuo Asp 121, cuando en las estructuras aparece el puente de hidrógeno de $H^{\delta 2}$ con el grupo carboxilato de la cadena

lateral de Asp 121 (González, 1991, Santoro et al., 1993); posiblemente en la otra estructura (la que predomina a pHs ácidos) se encuentre formando un puente de hidrógeno con el CO de Val 118, Cys 110 o la cadena lateral de Glu 111. En la Fig II.40 se muestran las dos posibles posiciones del anillo. El equilibrio dinámico entre las dos formas también cambia con la concentración de fosfato (Rico et al., 1991). Aunque desconocemos las causas de este desplazamiento del anillo al aumentar el pH, posiblemente está relacionado con la desprotonación del Asp 121 y el exceso de carga negativa que comienza a existir en el centro activo. Ninguna de las otras cadenas aromáticas muestra un comportamiento semejante.

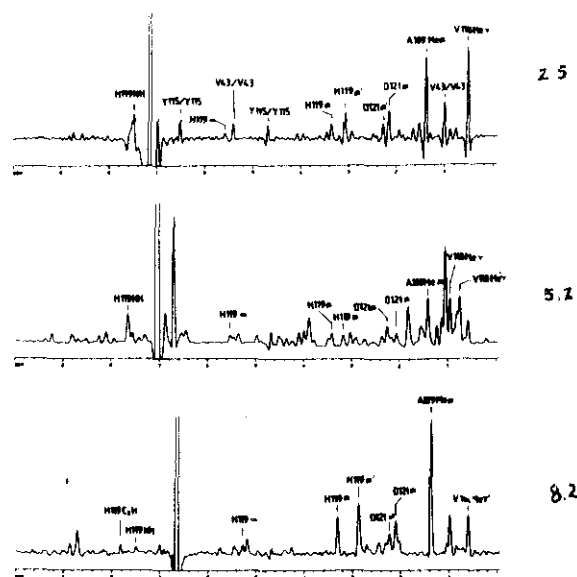


Fig II.39: Filas de experimentos NOESY correspondientes a la frecuencia del protón $H^{\delta 2}$ de His 119 a diferentes pHs.

En anteriores estudios de Ribonucleasa A con nucleótidos (Hahn et al., 1985), se mostraba que haciendo uso de la secuencia p11 (Hore, 1989), dirigida a no presaturar los protones del H_2O y otros con intercambio rápido, aparecía una señal muy ancha a un desplazamiento químico de 11.0 ppm (298 K y pH = 5.5). El hecho de que dichos autores usaran proteína libre de fosfato (tipo Worthington) en vez de Sigma, el que se observara esa señal a campo tan bajo y que se apreciara cuando no se presaturaba el H_2O , señala que el protón está unido a un nitrógeno, o a un oxígeno. Para intentar ver a qué residuo correspondía se realizaron NOEs usando la secuencia p11 y una de excitación selectiva (Kessler et al., 1986); los resultados fueron en todos los casos negativos, por lo que únicamente podemos aventurar que se trate de un protón de una Histidina implicada en el centro activo (dada su desaparición en presencia del anión). Todo apunta hacia el protón $H^{\delta 2}$ unido por el puente de hidrógeno con la cadena lateral del Asp 121. Alternativamente, dicho protón lábil podría corresponder al protón fenólico de Tyr 25

enlazado por puente de hidrógeno al carboxilato de Asp 14, aunque resulta poco probable debido a que dicha señal aparece en Ribonucleasa libre de fosfato (tipo Worthington) y no en la que contiene pequeñas cantidades del anión (tipo Sigma).

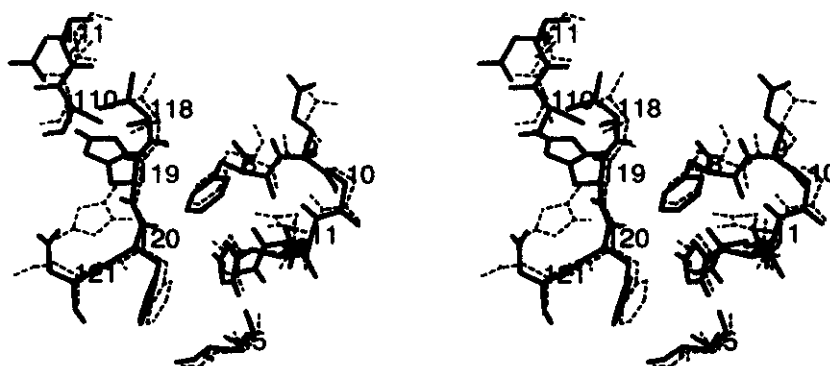


Fig II.40: Vista estereoscópica del centro activo de la proteína mostrando las dos posiciones del anillo de His 119. Se muestra la superposición de dos estructuras promedio, la correspondiente a la dirigida hacia la Val 118 (trazo sólido) y la de la posición dirigida hacia el Asp 121 (trazo punteado) (de Rico et al., 1991).

2.3.5. DESNATURALIZACIÓN A pHs ÁCIDOS.

A pHs extremos la estabilidad de las proteínas decrece en gran medida (Tandford, 1962). Ello se atribuye a que cuando nos alejamos de pHs neutros van neutralizándose las cargas de un signo y acumulándose las del contrario, las cuales debido a su repulsión tienden a distanciarse, adoptando el estado desnaturalizado y desestabilizando por tanto la proteína globular nativa. En el caso de la Ribonucleasa A, a pH < 2.0 una vez neutralizadas las cargas negativas de los grupos carboxilato de Aspárticos, Glutámicos y resto carboxilo terminal tendríamos acumuladas principalmente en la superficie de la proteína 18 cargas positivas correspondientes a los 10 residuos de Lisina, 4 de Arginina y 4 de Histidina.

En algunas proteínas se ha detectado en la desnaturalización ácida un estado intermedio denominado estado A o "glóbulo fundido" (Kuwajima, 1989), caracterizado por un incremento nulo de la entalpía con respecto al estado desnaturalizado, la conservación de la estructura secundaria y la pérdida de la orientación de las cadenas laterales característica de la estructura terciaria. Este estado A ha sido propuesto como un intermedio universal en el plegamiento de proteínas.

El intercambio, esto es, el paso, entre la forma nativa y la forma desnaturalizada tanto en la desnaturalización térmica como en la ácida, es un intercambio lento en la escala de tiempos en la espectroscopía de RMN. Ello quiere decir que se observan resonancias separadas para ambas formas cuya intensidad es proporcional a la población del estado que representa. Esta cinética lenta de desnaturalización implica una elevada barrera de activación, correspondiente al estado de transición de la desnaturalización global. La existencia de un intermediario en el plegamiento podría rebajar la barrera de activación acelerando la cinética de interconversión entre las formas nativa y desnaturalizada con la consecuencia de que así se obtendría una sola señal con un desplazamiento químico promediado.

Muchas de las señales protónicas de Ribonucleasa A cuya variación con el pH se ha seguido en este trabajo muestran una variación continua en su desplazamiento químico en función del pH cuando se examina esta variación en el extremo de pHs ácidos. Esta variación continua que en la mayor parte de los casos implica protones peptídicos, tiende a pHs ácidos hacia el valor de desplazamientos químicos característico del estado desnaturalizado (en la Fig.II.41 se muestran los NHs de los residuos del S-péptido y el valor al que parecen desplazarse, encontrado en el estado *random-coil*). Los protones no lábiles (los H_{α} y otros unidos a átomos de carbono) no muestran esta variación salvo los pertenecientes a los residuos Ala 19 y Ala 20. La variación continua observada de desplazamientos químicos habría que relacionarla como se ha expuesto más arriba, con la presencia de un intermediario que proporcionara un intercambio rápido entre los dos estados. Los protones peptídicos que muestran este comportamiento de promediación ácida son los pertenecientes al intervalo Ala 5-Met 13 en la hélice I (con excepción de Ala 6 e His 12); Thr 17, Ser 18, Ala 19, Ala 20, Ser 23, Met 30, Lys 31, Ser 32, Asn 34, Lys 37, Asp 38 y Lys 41, en el final de la Hélice II y al lazo que une ésta con la hebra β_1 de la primera lámina; Met 79, Thr 82, Asp 83, Arg 85 y Glu 86 de la primera lámina; Gly 88, Ser 89, Ser 90, Lys 91 y Tyr 92 del segundo giro β , y Asn 103, His 105 y los de la hebra β_7 que finaliza con el extremo C-terminal.

Con esta información sería posible delinear la estructura del intermediario, que conservaría un núcleo bien estructurado cuyas resonancias protónicas mostrarían un intercambio lento y del que formarían parte la hélice III con sus cadenas laterales interdigitizadas con las de la segunda lámina. El S-péptido, la región final de la hélice II, los lazos, giros o vueltas en general y parte de la segunda lámina presentarían una estructura más lábil que permitiría un intercambio más rápido entre las formas nativa y desnaturalizada, dando lugar a resonancias con desplazamiento químico promediado. El hecho de que sean los protones peptídicos los que sientan la variación del intercambio podría

hacernos pensar que el esquema obtenido es contrario al postulado por el "glóbulo fundido" puesto que aquí las cadenas laterales permanecen rígidas como en la estructura nativa y es el esqueleto el que parece fluctuar, no obstante tal estado parece haberse encontrado para la Ribonucleasa A (Goto & Fink, 1990) sin dar detalles de sus características, a base de aumentar la concentración salina a pHs muy ácidos. Probablemente el hecho de que sólo "noten" tal intercambio los protones peptídicos parece estar relacionado con la mayor sensibilidad de éstos (Forman-Kay et al., 1992)

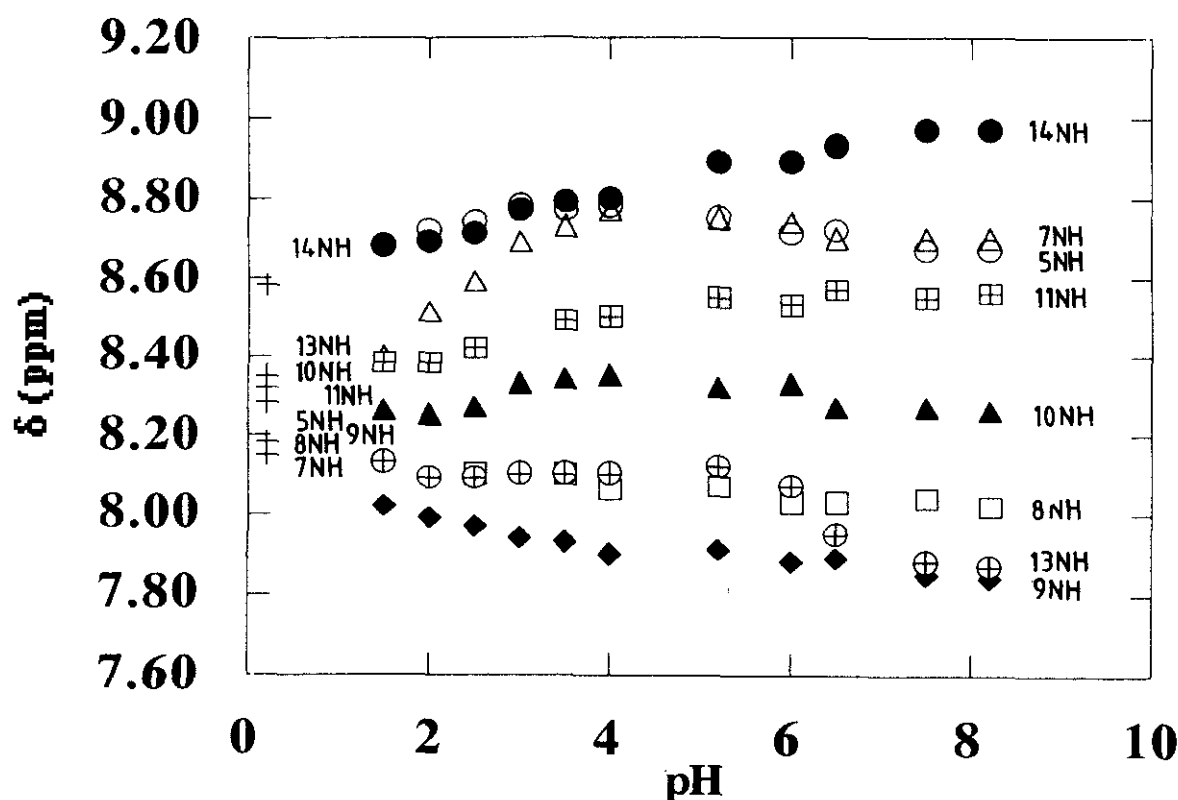


Fig. II.41: Curvas que muestran el cambio en δ de los protones peptídicos de la hélice I de Ribonucleasa A. Los puntos en el extremo de pHs ácidos indican los valores que tendría cada protón en el "random-coil".

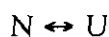
Sería de interés comparar en futuros trabajos las propiedades de plegamiento del presunto estado en la enzima con nuestras propuestas estructurales obtenidas en la titulación de la Ribonucleasa a pHs muy ácidos. Como puede verse en la Tabla II.4, la protonación sucesiva de una serie de grupos carboxilato de pK_a relativamente bajo, tales como la Val 124 (carboxilato terminal), Asp 38, Glu 2 y Asp 14, puede desencadenar la formación del intermediario de núcleo rígido y segmentos conformacionalmente lábiles. En este contexto el bajo pK_a de Asp 14 resulta consistente con la involucración de este grupo en un enlace de hidrógeno con el protón fenólico de la Tyr 25 (Santoro et al., 1993). Como ya se ha comentado, a pesar de nuestros esfuerzos no hemos determinar el valor exacto de su titulación. La Tyr 25 es una de las tres tirosinas que poseen un pK_a

muy alto (Tandford, 1962). El hecho de este valor de titulación tan alto haría que la ΔG fuera mayor que 2 Kcal mol⁻¹, lo cual unido al valor de la ΔG obtenida por el Asp 14, muestran la importancia de dicho puente para la estabilidad total de la proteína al sumar un tercio aproximadamente de la energía libre de la misma.

Mecanismo de apertura de la hélice e intercambio.

Podemos intentar dar forma cuantitativa a los resultados anteriores concentrándonos en los cambios del S-péptido. Estos cambios en el desplazamiento químico son lo suficientemente grandes, sobre todo en el caso de Ala 5 y Lys 7, como para demostrar que la apertura de la hélice es un mecanismo que depende del pH. Esta reacción es rápida, como ya se ha comentado, en la escala de la RMN, por lo que ellos cambian continuamente durante todo el proceso de apertura. Esta observación no es consecuencia, como podría pensarse, del comportamiento dinámico en los extremos de la hélice (descrito en el Capítulo III) pues no afecta exclusivamente a los extremos N- y C- terminales, por tanto la explicación más simple con los datos es que la hélice, tal y como se había sugerido está sujeta a una reacción de apertura y cierre, de desnaturalización y renaturalización.

Para intentar describir como es este comportamiento se puede asumir una reacción de dos estados:



donde N es la forma nativa y U es la desnaturaizada. Si asumimos que cada protón NH intercambia sólo desde el estado desnaturalizado, entonces la constante de intercambio de un protón dado (Kuwajima & Baldwin, 1983 b) es:

$$k_{ex} = k_c f_c$$

donde k_c es la constante de intercambio desde el estado desnaturalizado (como se describe en el Capítulo III) y f_c es la fracción de protones peptídicos que se encuentran en el estado desnaturalizado. Esta fracción puede calcularse a partir de los cambios en los desplazamientos químicos:

$$f_c = \frac{(\delta_N - \delta)}{(\delta_N - \delta_D)}$$

donde δ_N y δ_D son los desplazamientos químicos de la forma nativa y desnaturalizada, respectivamente y δ es el del protón en cuyas condiciones queremos obtener su fracción. El grado de protección, Kp (Capítulo III), puede entonces ser definido como:

$$K_p = 1/f_c$$

Para la Ala 5, podemos elegir como valores para el desplazamiento del estado desnaturalizado los que posee en el S-péptido, y eligiéndolo a pH = 2.5 (y 308 K) resulta ($\delta_N = 8.79$ ppm, $\delta_D = 8.32$ ppm y $\delta_{2.5} = 8.75$ ppm):

$$f_c = 0.08, \text{ con lo que } K_p = 11.75$$

que es mayor que la que podemos calcular para este protón por el procedimiento de intercambio (Capítulo III, **Fig I.4**), pues no es observado en tales condiciones. Si empleáramos el valor del desplazamiento químico que parece deducirse de las curvas de titulación, la fracción en estado desnaturalizado sería aún mayor con lo que K_p disminuiría, pero daría un valor observable, que contrasta con los resultados obtenidos.

Si repetimos el mismo razonamiento para la Lys 7, resulta, eligiendolos valores del estado desnaturalizado los del S-péptido (Kuwajima & Baldwin, 1983 b; M. Rico, resultados no publicados); con $\delta_N = 8.76$ ppm, $\delta_D = 8.18$ ppm y $\delta_{2.5} = 8.58$ ppm):

$$f_c = 0.31, \text{ con lo que } K_p = 3.20$$

muy alejado del valor que se observa experimentalmente. Si empleamos los valores de los desplazamientos químicos del estado desnaturalizado que se observa en la curva, esto es a pH = 1.5 resulta ($\delta_D = \delta_{1.5} = 8.40$ ppm):

$$f_c = 0.5, \text{ con lo que } K_p = 2.0$$

también muy diferente al valor registrado en las medidas experimentales.

Los resultados experimentales nos llevan entonces a concluir que: (a) en primer lugar, el modelo de dos estados no es adecuado para describir el comportamiento de desnaturalización a pHs ácidos observado para la Ribonucleasa, sino que la proteína antes de pasar al estado desnaturalizado pasa a través de un intermedio, desde el cual también intercambia, como habíamos concluido anteriormente, (b) que los valores que se obtienen en este capítulo del factor de protección, o lo que es igual de la fracción de moléculas que están en el estado desnaturalizado no coincide con los que se discutirán en el Capítulo III, con lo que posiblemente habrá que intentar encontrar una explicación a tal discrepancia..

Capítulo III

Dinámica y estabilidad de Ribonucleasas A y S

3.1. INTRODUCCIÓN.

La medida de cinéticas de intercambio de los protones peptídicos de proteínas con los deuterones del disolvente (Hvidt & Nielsen, 1966; Englander & Kallenbach, 1984) ocupan un lugar prominente entre los métodos existentes para estudiar experimentalmente la dinámica de proteínas. Un avance de fundamental importancia para estos estudios se produjo al poder combinar las técnicas de intercambio con la espectroscopía de RMN bidimensional (Wüthrich, 1986) que permite la asignación y el acceso al seguimiento de cinéticas de intercambio de protones peptídicos individuales. Más de un centenar de sondas atómicas individuales (en el curso de la proteína aquí estudiada) distribuidas en todo el volumen de la molécula han de permitir, en principio, una descripción plural y detallada de la estructura y dinámica de la proteína.

El estudio del intercambio H/D de protones peptídicos de Ribonucleasa A y Ribonucleasa S, combinado con la espectroscopía de RMN bidimensional, realizado en este capítulo, permite describir a nivel atómico la dinámica de la proteína, así como obtener información de interés sobre: (a) la estabilidad de la misma, (b) el proceso de desnaturalización y (c) las propiedades frente al intercambio H/D del estado desnaturalizado.

3.1.1. FACTORES QUE DETERMINAN EL INTERCAMBIO DE HIDRÓGENO EN PROTEÍNAS GLOBULARES.

Los átomos de hidrógeno de una proteína pueden clasificarse en tres grandes grupos en relación con sus propiedades de intercambio con los hidrógenos del medio acuoso: (a) los unidos a átomos de carbono, de intercambio muy lento, salvo contadas excepciones (C_6H en histidinas); (b) los unidos a oxígeno en serinas, treoninas y tirosinas (protones hidroxílicos y fenólicos, respectivamente) junto con los unidos a nitrógeno formando grupos amino, guanidinio y amidas primarias en cadenas laterales de lisinas, argininas, asparaginas y glutaminas, de intercambio rápido y (c) los unidos a nitrógeno formando amidas secundarias, como los grupos peptídicos de la cadena principal, de intercambio intermedio. Los estudios de intercambio que se describen en este capítulo se refieren principalmente a este último grupo de átomos de hidrógeno.

El continuo intercambio de los protones peptídicos de una proteína con los del disolvente no ocurre espontáneamente. La reacción está catalizada por ácidos y bases, concretamente, por los iones hidronio H_3O^+ e hidroxilo OH^- , existentes en el disolvente.

La química de este intercambio es bien conocida (Eigen, 1964). La constante cinética con la que intercambian los NH expuestos al disolvente, llamada constante intrínseca, puede escribirse como:

$$k_c = k_H[H^+] + k_{OH^-}[OH^-] + k_w \quad \{1\}$$

donde k_H y k_{OH^-} son las constantes de catálisis ácida y básica, respectivamente, y k_w es el término correspondiente a la catálisis del agua sin disociar (el cual es por tanto independiente del pH). La catálisis básica es mucho más eficaz que la catálisis ácida, por lo que el mínimo (el llamado pH_{\min}) en las curvas de k_c vs. pH se desplaza hacia pHs bajos, alrededor de $pH = 3.0$. El término de la catálisis acuosa es despreciable, en primera aproximación, (Englander & Poulsen, 1969) frente a los dos primeros términos. El intercambio varía pues, linealmente con las concentraciones de los iones: H_3O^+ y OH^- .

Los valores utilizados para k_H y k_{OH^-} en los cálculos realizados en el presente trabajo son los obtenidos por Englander y sus colaboradores (Englander & Poulsen, 1969) para la poli (DL-alanina):

$$k_H = 0.5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}, \quad k_{OH^-} = 5.6 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$$

usando $pK_w = 15.14$ a 293 K, obtenido de la ecuación de Covington (Covington et al., 1966) que da la dependencia de K_w respecto a la temperatura, en D_2O . Recientemente, (Jeng & Englander, 1991) se han recalculado los valores de las constantes ácida y básica, basándose nuevamente en los estudios de la poli (DL-alanina). Los resultados, obtenidos a la misma temperatura, no difieren mucho de los presentados arriba:

$$k_H = 0.27 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}, \quad k_{OH^-} = 5.7 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ y } k_w = 5.6 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

Sin embargo, dichos autores encuentran que el efecto catalítico del H_2O es importante en las proximidades del pH_{\min} , donde la dependencia de la constante con la concentración de ambos iones catalíticos no es lineal y proponen que el término k_w debiera ser tenido en cuenta en experimentos a bajo pH (Jeng & Englander, 1991). En el presente trabajo, los pHs más bajos explorados son de 2.5, valor que se eligió al desconocer los pH_{\min} para cada uno de los residuos a cada temperatura. A dicho pH, el término ácido tiene un peso notablemente mayor que k_w por lo que no se ha considerado el término de catálisis acuosa.

Los factores que intervienen en los dos términos catalíticos son sensibles a la temperatura. La entalpía de activación aparente (ΔH^\ddagger) medida en la poli (DL-alanina) para k_H es 15 Kcal mol^{-1} y para la catálisis básica 17 Kcal mol^{-1} (de éstas, $2.6 \text{ Kcal mol}^{-1}$

corresponden a la entalpía de activación de la cinética descrita por k_{OH^-} y $14.4 \text{ Kcal mol}^{-1}$ corresponden a la dependencia de K_w con la temperatura) (Roder, 1989; Englander & Poulsen, 1969; Englander & Mayne, 1992). Existe otra recopilación de datos (Gregory et al., 1983), efectuada también para la poli (DL-alanina) que presenta algunas discrepancias en los valores de la constante ácida y en los de ΔH^\ddagger en los términos catalíticos del agua y ácido. En este trabajo se han utilizado los valores dados más arriba por encontrarlos más fiables y por ser de uso más generalizado.

Las constantes de intercambio de protones peptídicos en cadenas de conformación aleatoria y, por tanto expuestos al disolvente, son sensibles también a los efectos electrónicos de las cadenas laterales vecinas. Estos efectos han sido calibrados en péptidos modelo (Molday et al., 1972) y convenientemente tabulados, con lo que es posible la evaluación de constantes cinéticas para un protón dado en cualquier secuencia peptídica. Mediante la utilización de pulsos cortos de desnaturalización térmica se han medido experimentalmente dichas constantes para protones concretos de las proteínas Ribonucleasa A (Robertson & Baldwin, 1991), citocromo c (Roder et al., 1985), lisozima del huevo (Radford et al., 1992) y lisozima del fago T4 (Lu & Daquillist, 1992). En general, las constantes evaluadas y las medidas experimentalmente, muestran una concordancia muy satisfactoria, si bien se ha encontrado que en algunos residuos hidrófobos, como valinas o isoleucinas, las constantes cinéticas medidas son aproximadamente tres veces más lentas que las evaluadas teóricamente.

Si bien, toda la discusión anterior se refiere al estado "random-coil" el estado nativo en proteínas globulares impone, lógicamente, restricciones al intercambio. Existen en dicho estado, protones peptídicos situados en el interior de la estructura globular, de forma que el simple acceso del disolvente a dichos protones se hace mucho más difícil. Sin embargo, existe otra causa más importante de ralentización del intercambio y es la participación del protón peptídico en un enlace de hidrógeno. Los puentes de hidrógeno pueden ralentizar el intercambio de hidrógenos aun cuando éstos se encuentren en la superficie (Englander & Kallenbach, 1984; Tüschien & Woodward, 1985 a y b). Ello es consecuencia de la química de las reacciones de transferencia de protones, las cuales requieren la formación de un enlace de hidrógeno entre el grupo que intercambia y el catalizador (Eigen, 1964). La gran mayoría de los protones calificados como lentos en los estudios de intercambio son protones que participan en enlaces de hidrógeno.

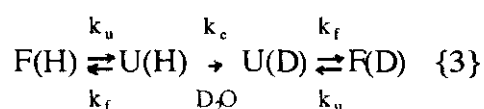
Surge, por tanto, la pregunta: *¿cuáles son los mecanismos por los que los hidrógenos impedidos por los puentes de hidrógeno pueden intercambiar con el disolvente?*. Aunque esta cuestión está siendo debatida actualmente (Englander & Kallenbach, 1984; Englander & Mayne, 1992), lo más probable es la ruptura del enlace

de hidrógeno (o su distorsión) de forma que sea posible el acceso del nuevo protón y la salida del anterior, realizándose así el intercambio. Esta ruptura transitoria de los enlaces de hidrógeno fue ya apuntada en los primeros trabajos del grupo de Linderstrøm-Lang (Hvidt & Nielsen, 1966). Los estudios subsiguientes con proteínas han confirmado este modelo, que se ha dado en llamar el **modelo estructural de desnaturalización**. (Englander & Kallenbach, 1984), el cual implica distorsiones cooperativas concertadas a pequeña escala de las estructuras proteicas.

En este modelo (Hvidt & Nielsen, 1966; Wagner & Wüthrich, 1979), el intercambio del hidrógeno implicado en el enlace se relaciona con los parámetros que dirigen la transición cooperativa entre unos estados plegados, que denotaremos por F, y unos estados desplegados, que llamaremos U. La transición entre ambas especies será descrita por una constante de desnaturalización, k_u , y una constante de renaturalización, k_f , o lo que es lo mismo por una constante de equilibrio de apertura local:

$$K_{op} = \frac{k_u}{k_f} \quad \{2\}$$

Un hidrógeno, por tanto, podrá intercambiar siempre que se produzca la ruptura de ese enlace de hidrógeno por la reacción de apertura, que lo deja expuesto al disolvente, desde donde intercambiará como uno de los péptidos modelo estudiados, es decir, con una cinética dada por k_c . Podemos, por tanto, establecer un esquema de reacción para todo el proceso como:



Obsérvese que cuando se produce el intercambio sólo se ha colocado una flecha entre las dos formas desnaturalizadas, no hay equilibrio debido a que las condiciones son fuertemente "deuterantes" (Hvidt & Nielsen, 1966). El camino de reacción aparece representado en la Fig. III.1, donde se indican los parámetros cinéticos de interés.

Bajo condiciones que favorezcan energéticamente el estado plegado ($k_f \gg k_u$), las expresiones cinéticas aplicadas a {3} nos llevan (Hvidt & Nielsen, 1966) a una constante de intercambio, k_{ex} , definida como:

$$k_{ex} = \frac{k_u k_c}{k_f + k_d} \quad \{4\}$$

Dos situaciones límites se pueden distinguir según sea la relación entre k_f y k_c .

En el límite donde las fluctuaciones estructurales son rápidas comparadas con la constante de intercambio intrínseco ($k_f \gg k_c$), se tiene:

$$k_{ex} = K_{op} k_c \quad \{5\}$$

es decir, la constante de intercambio que se mide depende de la concentración de proteína desnaturizada que exista, la cual viene determinada por el valor de K_{op} (definida en {2}). Esta situación cinética límite, conocida como **límite EX₂** (Hvidt & Nielsen, 1966), es la que se encuentra en condiciones ordinarias en una proteína donde el estado plegado es muy estable y la constante k_c es lenta.

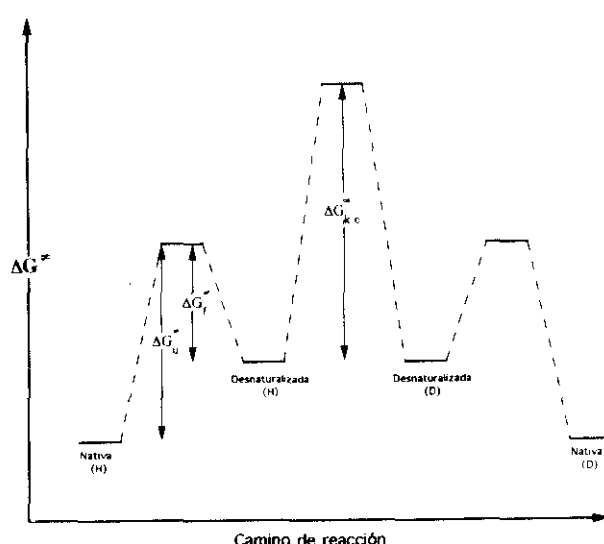


Fig. III.1: Camino de reacción para el modelo estructural de desnaturización.

En todos los estudios realizados (Wagner & Wüthrich, 1979; Wagner, 1983; Wand et al., 1985; Roder, 1989; Radford et al., 1992) este límite es la condición prácticamente dominante. La magnitud de interés aquí es K_{op} , la cual contiene información sobre la estabilidad local de esa región de la proteína, estabilidad proporcionada por el (ó los) enlaces de hidrógeno que se rompen. Atendiendo a la relación termodinámica entre ΔG_{op} y K_{op} :

$$\Delta G_{op} = - R T \ln(K_{op}) \quad \{6\}$$

se puede escribir {5} como

$$\Delta G_{op} = - R T \ln\left(\frac{k_{ex}}{k_c}\right) \quad \{7a\}$$

donde todas las magnitudes pueden en principio determinarse experimentalmente (ó bien evaluarse como en el caso de k_c).

Hay que señalar que sólo será posible interpretar un incremento en las constantes cinéticas de intercambio como un cambio en la energía de estabilización, cuando la energía libre del estado desnaturalizado no haya variado (Englander & Mayne, 1992). Se dispone de dos especies químicas similares (que llamaremos A y B), para las que se puede suponer que el estado desnaturalizado es común, la diferencia de energía libre vendrá dada por una ecuación en la que no exista la dependencia respecto a ningún parámetro evaluado teóricamente:

$$\Delta\Delta G_{\text{op, EX}_2}^{\text{A-B}} = -R T \ln \left(\frac{k_{\text{ex}}^{\text{A}}}{k_{\text{ex}}^{\text{B}}} \right) \quad \{7b\}$$

que no es más que la diferencia entre las dos expresiones de {7a} para la especies A y B (Gooley et al., 1992). Estas relaciones pueden incluso utilizarse para detectar cambios locales de energía libre en estructuras intermedias (intermediarios) en el proceso de renaturalización de una proteína (A y B serían en este caso la estructura nativa y el intermediario, respectivamente).

El otro límite cinético se obtiene cuando las fluctuaciones estructurales son lentas con respecto a k_c , ($k_f \ll k_c$), con lo que {4} se simplifica a:

$$k_{\text{ex}} = k_u \quad \{8\}$$

En este límite (el llamado **límite EX₁**), el intercambio va a ocurrir desde cada unidad de apertura estructural y la constante de intercambio proporciona directamente la constante de desnaturalización. Las condiciones que favorecen este intercambio son: pH básico (con k_c muy rápido) y/o condiciones desestabilizantes (donde k_f es pequeña). Este límite sólo ha sido encontrado en condiciones muy drásticas para el BPTI (Roder et al., 1985 a; Roder, 1989).

La distinción entre los dos límites cinéticos es fundamental para la interpretación de los datos de intercambio. Para ello, hay que considerar la dependencia de la constante cinética del intercambio, k_{ex} , frente al pH (Wagner, 1983; Englander & Kallenbach, 1984; Roder et al., 1985 a). En el **límite EX₂**, la dependencia con el pH es la marcada por el valor de k_c , modificada ligeramente por la posible dependencia de K_{op} frente al mismo, mientras que en el **límite EX₁**, la única dependencia es la que tenga k_u , que suele ser muy pequeña, por lo que, en este caso, k_{ex} aparece como constante frente al pH. Una distinción más rigurosa entre ambos es la observación de que en el **límite EX₁**, el intercambio de los diferentes protones ocurre con una misma constante de una forma correlacionada. En cambio en el **límite EX₂**, el intercambio de un protón dependerá del proceso de desnaturalización local más efectivo para cada uno, de entre los muchos que

tienen lugar simultáneamente a lo largo de todos los segmentos de la proteína: las constantes de intercambio deberán pues mostrar valores muy diferentes.

Normalmente, en las representaciones (ver Fig. III.1, III.5 y III.7) para indicar el comportamiento dinámico, se utiliza el valor del factor de protección, K_p , definido como:

$$K_p = \frac{k_c}{k_{ex}} \quad \{9\}$$

que mide la proporción en que un protón en la proteína se protege frente al intercambio en comparación con un péptido o modelo sin estructura aparente, y el cual es proporcional a ΔG_{op} , según {7a}.

Aunque se han establecido una gran variedad de modelos para explicar el mecanismo de intercambio (Englander & Kallenbach, 1984), los cuales se centran fundamentalmente en la necesidad de penetración de los iones catalíticos hasta el NH, tales modelos llegan a conclusiones cualitativas que establecen correlaciones artificiosas entre k_{ex} y parámetros estructurales definidos. Los resultados de los que se dispone en la actualidad, junto con los aportados en este trabajo, parecen confirmar la generalidad del **modelo estructural de desnaturalización** para explicar el intercambio.

Existe un mecanismo que, contrariamente a la protonación del nitrógeno peptídico, se basa en la protonación del O peptídico: es la **O-protonación**. Este mecanismo para catálisis ácida está presente en la química de pequeñas amidas secundarias, de hecho, la gran diferencia en basicidad de los átomos peptídicos O y N muestra que la protonación del O es más común que la del N, aunque normalmente no se considera por creerla incompatible con los efectos de los sustituyentes observados para la catálisis ácida. El

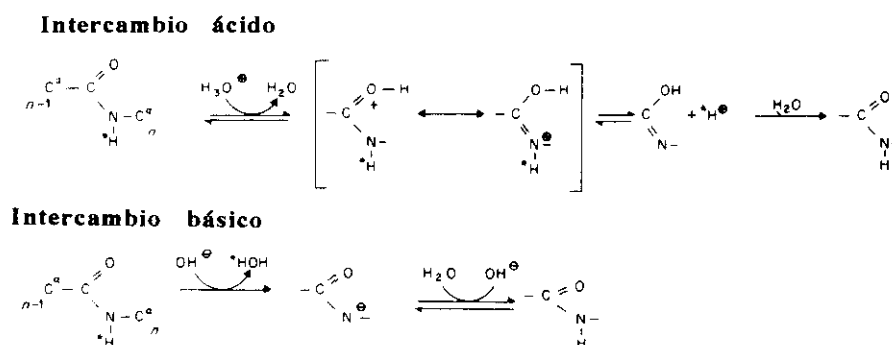


Fig III.2: Mecanismo de O-protonación (de Perrin & Arrhenius, 1982)

mecanismo ha sido descrito recientemente (Fig III.2) y se ha encontrado para algunas proteínas en los protones que se encuentran en la superficie (Perrin & Arrhenius, 1982; Tüschén & Woodward, 1985 b). En general, los NH peptídicos próximos a la superficie están orientados hacia el disolvente y sus átomos de O carbonílicos están orientados hacia el interior resultando con ello en grandes diferencias en la accesibilidad de uno y otro átomo, y en la posibilidad de una ralentización del intercambio para el caso de un mecanismo de **O-protonación**. Por supuesto, el hecho de que exista este mecanismo no descarta para nada el otro tradicional (el de la protonación del nitrógeno); se producirán los dos aunque desconocemos en qué medida cada uno de ellos.

3.1.2. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE ACTIVACIÓN DEL PROCESO DE INTERCAMBIO.

Los efectos de la temperatura sobre el intercambio han sido muy estudiados, pero no han sido correctamente interpretados en términos de los modelos que se han propuesto. Los parámetros de activación se obtienen normalmente a partir de medidas de k_{ex} a distintas temperaturas. La ecuación de Arrhenius relaciona las constantes de intercambio medidas, k_{ex} , con la energía de activación aparente, E_a (Glasstone et al., 1946):

$$E_a = -R \frac{d(\ln(k_{ex}))}{d(1/T)} = \Delta H^\ddagger + R T \quad \{10\}$$

donde ΔH^\ddagger es la entalpía de activación aparente. Si las energías obtenidas son del orden de varias Kcal mol⁻¹ y las temperaturas usadas no son muy altas, como ocurre en el presente trabajo, puede suponerse en buena aproximación que

$$E_a \approx \Delta H^\ddagger$$

Podrá obtenerse, por tanto ΔH^\ddagger , de la pendiente de la recta que resulte representando $\ln(k_{ex})$ frente a $1/T$.

De acuerdo con la teoría del estado de transición (Laidler, 1950), la energía libre aparente de activación, ΔG^\ddagger , es:

$$\Delta G^\ddagger = -R T \ln \left(\frac{h k_{ex}}{k_B T} \right) \quad \{11\}$$

donde h y k_B son las constantes de Planck y Boltzmann, respectivamente. La conocida relación termodinámica

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger \quad \{12\}$$

introduce finalmente la entropía de activación, ΔS^\ddagger . Representando pues, valores de $\Delta G^\ddagger / T$ frente a $1/T$, se obtiene ΔH^\ddagger como pendiente de la recta e ΔS^\ddagger como ordenada en el origen.

Debido a la existencia de los dos límites cinéticos expuestos, y de las diferentes clases de fluctuaciones posibles, hay que ser cauto en la interpretación de las ΔH^\ddagger . Para los dos límites cinéticos, las entalpías aparentes de activación se definen como:

$$\Delta H_{ap, EX_1} = \Delta H_{k_u}^\ddagger \quad \{13\}$$

$$\Delta H_{ap, EX_2} = \Delta H_{k_u}^\ddagger - \Delta H_{k_f}^\ddagger + \Delta H_{k_c}^\ddagger \quad \{14\}$$

donde se ha puesto de manifiesto que es una entalpía de activación aparente. Se observa de {14} que los valores de la diferencia de las dos entalpías de activación, no es más que la entalpía de desnaturalización de la proteína, ΔH_{op}

$$\Delta H_{op} = \Delta H_{k_u}^\ddagger - \Delta H_{k_f}^\ddagger \quad \{15\}$$

de tal manera que si conocemos el valor de la entalpía de activación para k_c , podemos obtener un valor de ΔH_{op} , para cada protón en particular. Englander y Poulsen (Englander & Poulsen, 1969) determinaron los valores de los parámetros de activación para la poli (DL-alanina): $\Delta H^\ddagger \approx 17 \text{ Kcal mol}^{-1}$ y $\Delta S^\ddagger \approx 27 \text{ Cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

De igual forma que se ha definido un valor de ΔH^\ddagger aparente según {14} puede definirse un ΔG^\ddagger aparente, por el uso de {11} y {5}. Con ambos parámetros termodinámicos, y según {12} se podrá obtener una ΔS^\ddagger aparente.

A partir de datos bibliográficos, puede determinarse (Englander & Kallenbach, 1984), que la dependencia de k_f con la temperatura es menor que la de k_c , encontrándose que para un único tipo de fluctuaciones:

$$\Delta H_{ap, EX_2} > \Delta H_{ap, EX_1} \quad \{16\}$$

lo que concuerda con los resultados encontrados en proteínas (Roder et al., 1985 a). Hasta ahora hay pocos datos en la bibliografía referentes a estos parámetros cinéticos, encontrándose tabulados únicamente los medidos para poli (DL-alanina), ligeramente discrepantes entre dos grupos de trabajo (Englander & Poulsen, 1969; Gregory et al.,

1983), y los correspondientes al BPTI (Richarz et al., 1979; Tüschén & Woodward, 1985 a).

3.1.3. INTERCAMBIO DE PROTONES PEPTÍDICOS EN EL SISTEMA RIBONUCLEASA. ANTECEDENTES.

El comportamiento frente al intercambio de los protones peptídicos de la Ribonucleasa A ha sido objeto de un gran número de estudios, utilizando una diversidad de técnicas, tales como la del etiquetado con deuterio (Linderstrøm-Lang & Schellman, 1959; Hvidt & Nielsen, 1966), espectroscopía infrarroja y ultravioleta y etiquetado con tritio. Mediante estas técnicas se mide el decaimiento con el tiempo de la concentración de un determinado isótopo, proporcionando por tanto resultados globales respecto a la cinética de intercambio que afectan al conjunto de los protones peptídicos de la proteína. Los intentos de fraccionamiento o discriminación de distintos grupos de protones respecto a sus propiedades de intercambio, han dado con frecuencia resultados contradictorios. La técnica de etiquetado con tritio, en sus diferentes variantes, ha sido la más empleada para obtener información acerca de la estructura nativa y del estado desnaturizado (Woodward & Rosenberg, 1970, 1971).

Estas técnicas se han aplicado también a la Ribonucleasa S, un complejo formado por los fragmentos denominados S-péptido (residuos 1-20) y S-proteína (residuos 21-

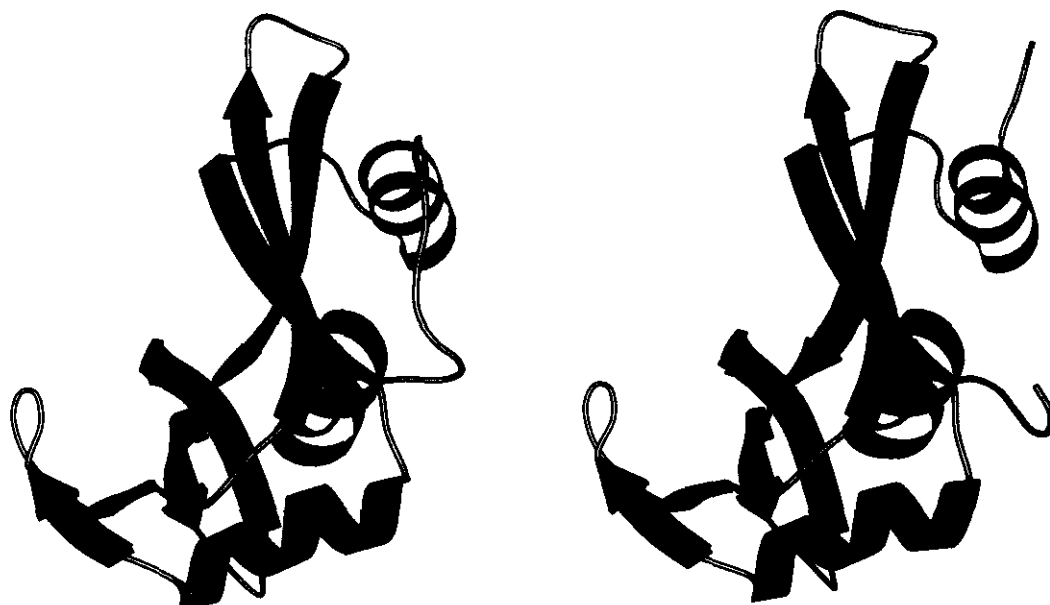


Fig. III.3.: Esquema mostrando las dos estructuras de la Ribonucleasa A y la S, donde se aprecia el corte introducido por la enzima. Las figuras fueron obtenidas con el programa MOLSCRIPT (Kraulis, 1991).

124), obtenidos por escisión con subtilisina de Ribonucleasa A (Richards & Wyckoff, 1971) (Fig.III.3). Mediante la combinación de técnicas de etiquetado con tritio y RMN (Schrier & Baldwin, 1976; Kuwajima & Baldwin, 1983b) o con la separación de los fragmentos trípticos (Rosa & Richards, 1979, 1981) se obtuvo por primera vez información individual respecto a determinados protones, principalmente aquellos pertenecientes al S-péptido. La información obtenida en estos últimos estudios es contradictoria: mientras los autores que usan el tritio (Rosa & Richards, 1979) encuentran que el intercambio en esta zona es prácticamente igual al de los péptidos sin estructura, los que usan la técnica de RMN (Kuwajima & Baldwin, 1983 b) observan una gran variedad en las constantes de intercambio.

También se han aplicado las técnicas del intercambio para medir la estabilidad de la Ribonucleasa A sin el fragmento C-terminal, encontrándose que las medidas cinéticas demostraban la menor estabilidad de la especie química, como consecuencia de su diferente plegamiento (Roy et al., 1986).

Con el desarrollo de las técnicas de difracción de neutrones y la espectroscopía de RMN bidimensional, se obtuvo finalmente información cualitativa respecto al comportamiento frente al intercambio de protones individuales de Ribonucleasa en el estado cristalino (Wlodawer et al., 1983) y en disolución tanto en forma nativa (Rico et al., 1989) como desnaturalizada (Robertson et al., 1991).

Se han realizado medidas de intercambio no sólo para la estructura nativa, sino también para estructuras transitorias, tales como la del "intermediario" o "intermediarios" cinéticos en el proceso de renaturalización de la Ribonucleasa (Udgaonkar & Baldwin, 1988, 1990). Mediante una combinación de pulsos de adición de diferentes medios es posible etiquetar con un determinado isótopo un intermediario cinético y estudiar posteriormente por RMN-2D su población en función del tiempo de renaturalización, una vez que el intercambio ha sido detenido actuando sobre el pH y la temperatura.

Las razones que nos han llevado a realizar un estudio cuantitativo de las cinéticas individuales de intercambio de los protones peptídicos de Ribonucleasa A y Ribonucleasa S, ya apuntadas en la introducción, pueden resumirse en: 1) descripción de la dinámica molecular de estas enzimas en términos estructurales y energéticos; 2) verificación de la propuesta de obtener datos termodinámicos acerca del proceso de desnaturalización en condiciones distantes de las del cambio de fase, a partir de las cinéticas de intercambio más lentas; 3) aclaración de contradicciones en las medidas de cinéticas individuales y consecuente selección de los modelos apropiados de desplegamientos locales; 4) verificación de la validez del modelo estructural de desnaturalización y 5) obtención de un punto

de referencia de garantía para la correcta caracterización estructural de intermediarios con base en datos de intercambio.

3.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

3.2.1. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

La Ribonucleasa A y la Ribonucleasa S fueron productos de Sigma (tipo XII, para ambas) y se usaron sin ninguna purificación posterior. Estas muestras contienen fosfato. Los experimentos se realizaron a dos valores de pH:

- 1.- pH = 6.0. Tampón fosfato ($\text{PO}_4\text{D}_2^-/\text{PO}_4\text{D}^{2-}$) (Sober, 1968). Estos experimentos se han tomado como referencia para el resto de los estudios.
- 2.- pH = 2.5. Tampón de glicina/HCl (Sober, 1968). Estos experimentos se realizaron a fin de determinar el comportamiento de los protones más rápidos y más externos de la Ribonucleasa A.

La concentración final de la proteína en cada una de las muestras, para los tres diferentes pHs fue de 4 mM, con una concentración de 0.2 M de NaCl. Los pHs se midieron con un electrodo de vidrio Ingold, calibrado frente a tampones acuosos ordinarios. Las medidas realizadas no se corrigieron por el efecto isotópico, y reflejan la lectura obtenida. Las muestras se prepararon añadiendo 25 mg de proteína a 0.5 ml del tampón y se ajustó inmediatamente el pH con DCl ó NaOD. Las constantes cinéticas se determinaron a partir de medidas de intensidad de población protónica a distintos tiempos transcurridos desde la disolución de la proteína en D_2O .

En la realización de las medidas se han seguido tres procedimientos distintos:

- 1.- Dado que las medidas a pH = 6.0 iban a constituir la referencia de posibles comparaciones con otras proteínas, era deseable intentar detectar el mayor número posible de protones, evitando el intercambio total de ellos durante el largo tiempo de adquisición del experimento. Para ello, se preparaba un número de muestras igual al de medidas a realizar con distintos tiempos de intercambio; estas muestras se sumergían inmediatamente en un baño termostatzado a la temperatura elegida. De aquí se extraían a los tiempos deseados, se liofilizaban y congelaban a 253 K, hasta que pudiera realizarse el experimento de RMN. Durante todo el proceso de congelación, el intercambio es prácticamente nulo, ya que la muestra se encuentra en estado sólido y a baja temperatura; con objeto de que el intercambio fuera también despreciable durante la adquisición del experimento, el pH se ajustaba a un

valor de 2.5 (cercano al mínimo de intercambio), una vez disuelto el liofilizado en 0.5 ml de D₂O.

2.- Para el resto de los pHs y de las temperaturas, las muestras, una vez preparadas y ajustado el pH, se introducen directamente en el espectrómetro, que previamente se ha termostatizado a la temperatura deseada. Los espectros se adquieren a intervalos determinados, durante los cuales la muestra sigue intercambiando. Este procedimiento presenta la ventaja sobre el anterior de que sólo es necesario preparar una única muestra, y que además no se manipula en todo el tiempo del experimento. Presenta en cambio, el inconveniente de que se detectan únicamente los protones más lentos, pues para los más rápidos la intensidad protónica decae por completo durante el tiempo de adquisición del experimento.

3.- Es una mezcla de los dos anteriores. La muestra se coloca en el baño termostatizado, se extrae del mismo a los tiempos deseados y se introduce en el espectrómetro, que se encuentra a la misma temperatura del baño. Los espectros se adquieren sin perturbar en absoluto la muestra, con lo que el tiempo de adquisición se contabiliza como tiempo de intercambio. De esta forma, es posible observar los protones más lentos sin necesidad de consumir tiempo de instrumento, pues la mayor parte del intercambio se realiza en el baño.

3.2.2. OBTENCIÓN Y PROCESADO DE LOS ESPECTROS DE RMN.

Los espectros se obtuvieron con un espectrómetro *Bruker AMX-600*, de 14 Teslas, que opera a una frecuencia para el ¹H de 600 MHz. El espectrómetro va equipado con un ordenador *Aspect X32*.

Para la medida de intensidades protónicas se realizaron experimentos de tipo COSY adquiridos en el modo absoluto (Nagayama et al., 1980) acumulando 32 barridos de 2048 palabras (2K palabras, donde cada palabra equivale a 4 bytes) en la dimensión F2 y 256 incrementos en la dimensión 1 (F1). Ello le confiere a la matriz de datos un tamaño de 2048 × 256. La anchura espectral fue de 6000 Hz en ambas dimensiones. La duración de cada experimento es de 1 h 22 min. Este tiempo de experimento relativamente corto, nos permite obtener un número grande de puntos en las medidas (un promedio de 16 tiempos diferentes) con una relación señal/ruido suficientemente buena. La eliminación del agua residual se hizo mediante presaturación durante el tiempo de relajación de los espines (Hore, 1989).

La temperatura de la sonda del espectrómetro se controló mediante el acoplamiento de una unidad *Haake* de enfriamiento de aire. La regulación de temperatura se realiza con la unidad *BVT 2000* Eurotherm de Bruker. La precisión es de $\pm 0.1^\circ \text{C}$. El baño para el primer procedimiento descrito se reguló mediante una resistencia Julabo Paratherm I. La precisión es de $\pm 0.1^\circ \text{C}$.

Las medidas se procesaron con el programa Bruker-UXNMR. El tamaño de la matriz de datos espectrales era de $2 \text{ K} \times 1 \text{ K}$ palabras en las dimensiones F_2 y F_1 , respectivamente. En la apodización se utilizaron ventanas sen^2 con desplazamientos de $\pi/12$ en ambas dimensiones. La resolución digital fue de 0.24 Hz por punto en F_2 y 3 Hz por punto en F_1 . La línea base de los espectros se corrigió con un polinomio de 5° grado. Como señal de referencia para los desplazamientos químicos (δ cero) se utilizó la señal del TSP (la sal sódica del ácido 3-trimetilsilil (2,2,3,3- $^2\text{H}_4$) propanoico).

3.2.3. PROCESADO Y TRATAMIENTO DE LOS DATOS.

Para la Ribonucleasa A se obtuvieron dos conjuntos de medidas, referidas en los dos casos a la zona de la huella dactilar (correlaciones COSY NH-H_α intra-residuo) y correspondientes en el primer caso, a la región por encima de la diagonal (es decir, $\text{NH}(F_2)\text{-H}_\alpha(F_1)$) y en el segundo a la de debajo de la diagonal ($\text{H}_\alpha(F_2)\text{-NH}(F_1)$). En ambos casos se calibró el ruido midiendo en zonas en las que no aparecen señales. Con la utilización de los dos conjuntos, fue posible obtener una estimación de la incertidumbre en los valores determinados para las constantes cinéticas. Para la Ribonucleasa S, se utilizó sólo el conjunto de señales de por encima de la diagonal.

Para su correcta correlación con poblaciones fraccionales, las intensidades absolutas medidas han de referirse a la de alguna señal cuya intensidad sea invariable con el tiempo, cuyo origen sea conocido y que esté suficientemente bien aislada. Una de las señales de correlación que mejor cumple con estos requisitos es la correspondiente a protones aromáticos de tirosinas o bien las que muestran la correlación entre un metilo y su protón adyacente. Aquí se escogió como referencia las correlaciones orto-meta de la Tyr 25.

Las intensidades relativas de las señales correspondientes a los protones peptídicos medidos se representaron frente a los tiempos de intercambio. Las curvas obtenidas se ajustaron a una ecuación cinética de primer orden de la forma:

$$I_{\text{re}} = A \exp(-k_{\text{ex}} t)$$

donde A es el factor preexponencial, que mide la intensidad de la señal al tiempo cero (esto es, inmediatamente a la disolución de la muestra), t es el tiempo, I_{re} es la intensidad relativa medida con las correcciones efectuadas por la estimación del error cometido en la medida de la integral y k_{ex} es la constante cinética de intercambio de todo el proceso. Los datos se ajustaron por el procedimiento de mínimos cuadrados, para determinar A y k_{ex} , con el programa Kaleidagraph (Adelbeck Software). Todas las curvas seguían una ecuación como la escrita. Para el procedimiento en que se utilizaron dos conjuntos de medidas, los valores de k_{ex} obtenidos fueron muy parecidos (Tabla III.1); únicamente se observaron diferencias significativas para aquellos protones con desplazamiento químico cercano al de la señal residual del agua, lo que es explicable al disminuir la transferencia de magnetización $H_{\alpha} \rightarrow NH$ por saturación del primer espín. Las diferencias observadas entre las constantes cinéticas procedentes de uno y otro conjunto de medidas (Tabla III.1) son como se ha dicho, un primer índice de la reproducibilidad de las medidas y de la incertidumbre en los valores de k_{ex} .

Tabla III.1

Comparación de las k_{ex} de Ribonucleasa A procedentes de la medida de las regiones espectrales situadas por encima y por debajo de la diagonal. Entre paréntesis se incluye la incertidumbre. Condiciones: pH = 6.0 (tampón fosfato), 313 K y 0.2 M de NaCl.

Residuo	$k_{ex} (h^{-1}10^3)$	$k_{ex} (h^{-1}10^3)$
Gln 74	5.6 (± 0.7)	6.1 (± 0.5)
Ile 106	3.8 (± 0.4)	3.9 (± 0.5)
Val 108	1.1 (± 0.1)	1.2 (± 0.2)
Ala 109	2.5 (± 0.1)	2.3 (± 0.3)
Val 118	2.3 (± 0.3)	2.4 (± 0.2)

3.2.4. ESTIMACIÓN DE ERRORES.

Hasta ahora no se ha hecho ninguna referencia sobre la presencia de los errores cometidos en todo el proceso experimental y en el proceso de los datos. Mientras algunos autores se limitan a hacer una estimación del error cometido en todo el proceso (Paterson et al., 1991), hay otros que no comentan nada (Goodman & Kim, 1991) y unos terceros que dan una estimación muy aceptable del error en todo el tratamiento de los datos (Wand

et al., 1985). Aquí se ha seguido este último procedimiento, a fin de tener una valoración de la incertidumbre. En el procedimiento de medida, para evaluar el ruido de fondo (valor de la integral en zonas donde no existe señal), se integran 10 zonas de este tipo y se realiza un promedio. La expresión de la intensidad relativa de una determinada correlación NH-H α es:

$$I_{re} = 2 \left(\frac{(I_s - I_r)}{(I_{aro} - I_r)} \right)$$

donde I_s es la intensidad absoluta de la señal que, I_{aro} es la intensidad absoluta de la señal que tomamos como referencia e I_r es la intensidad promediada del ruido. El factor 2 que aparece en el segundo miembro es una consecuencia del hecho de que a la señal de referencia contribuyen dos transferencias orto y meta simétricas.

El valor de I_r habría de ser nulo si el ruido fuera aleatorio. En realidad I_r refleja pequeñas desviaciones sistemáticas del fondo local sobre el fondo promediado total. Aún siendo un valor normalmente pequeño, su efecto sobre señales de una intensidad pequeña

Tabla III.2

Comparación de las k_{ex} medidas restando ruido y sin restarlo en la región por encima de la diagonal para Ribonucleasa A. Entre paréntesis se da la desviación estándar.

Condiciones: pH = 2.5 (tampón de glicina), 308 K y 0.2 M de NaCl.

Tratamiento Residuo	k_{ex} (min ⁻¹ 10 ⁵)	k_{ex} (min ⁻¹ 10 ⁵)
	$I_r = 0$	$I_r = I_r$
Lys 7	130 (± 20)	370 (± 70)
Glu 9	42 (± 3)	48 (± 8)
Ala 56	33 (± 5)	40 (± 4)
Gln 60	15 (± 2)	16 (± 2)
Gln 74	6.3 (± 2.2)	6.6 (± 2.2)
Ile 81	3.5 (± 0.9)	3.4 (± 0.8)
Ile 106	5.9 (± 0.4)	5.9 (± 0.1)

puede ser grande en términos relativos. Para verificar el efecto de I_r sobre los valores finales de k_{ex} se trataron los datos de un mismo experimento de dos formas: teniendo o no teniendo en cuenta el valor de I_r . Los valores de k_{ex} no resultaron afectados (ver

Tabla III.2) salvo en los casos de intercambio rápido (k_{ex} grande) como es el caso del residuo Lys 7.

En virtud de las medidas efectuadas, los valores promediados en ambos casos, y los coeficientes de regresión calculados (con un intervalo de confianza del 90 %) (Spiridonov & Lopatkin, 1983), cada k_{ex} tendrá una incertidumbre entre un 20 % y un 30 %.

3.2.5. DETERMINACIÓN DE LAS ENERGÍAS LIBRES A PARTIR DE LOS DATOS DE INTERCAMBIO.

Para evaluar la estabilidad y dinámica de una proteína, una vez determinadas las constantes cinéticas de intercambio ha de conocerse previamente el modelo de intercambio al que la proteína responde. Si éste se sitúa en el **límite EX₂**, como es el normalmente observado en proteínas (Radford et al., 1992), la energía libre de apertura (local o total) se determina mediante la expresión {7a}. En ella aparece la constante cinética de intercambio intrínseca, k_c , que es preciso evaluar y que depende de la secuencia, el pH y la temperatura. Para la evaluación de energías libres de apertura a partir de datos de intercambio se confeccionó un programa de ordenador que admite como datos el conjunto de constantes calculadas (véase 1.1), las cuales incluyen las correcciones electrostáticas para cadenas laterales vecinas y valores para la energía de activación para la catálisis del intercambio por los iones H^+ y OH^- . Para el caso en que el pH es cercano a algún pK_a , de forma que existen poblaciones significativas de los dos estados del grupo ionizable que se considere es necesario evaluar una constante que tenga en cuenta estos diferentes estados (como es el caso de las Histidinas y residuos adyacentes a ellas a pH = 6.0).

Recientemente, Robertson y Baldwin (Robertson & Baldwin, 1991) han determinado los valores de k_c de 31 residuos de Ribonucleasa A a 65° C, encontrando algunas discrepancias con los valores evaluados por las reglas de Molday (Molday et al., 1972). Dado que dichos valores son experimentales y no dependen por tanto de ninguna aproximación, ellos son más fiables que los calculados teóricamente. No obstante, para ser utilizados, dichos parámetros han de transferirse a nuestras condiciones experimentales de medida (temperatura y pH). Para ello, se siguieron dos aproximaciones diferentes:

- 1.- Utilizando los datos de $pH_{mín}$ y $k_{mín}$, dados por Robertson y Baldwin (Robertson & Baldwin, 1991) para cada protón medido, se impone a {1} la condición de mínimo que se reduce a:

$$k_{H^+} = \frac{k_{mín}}{2 [H^+]_{mín}}$$

de la que se obtiene directamente el valor de la constante ácida, k_H^+ . Mediante una expresión similar se obtiene k_{OH^-} . Para encontrar los valores de k_H^+ y k_{OH^-} a temperaturas distintas de 65° C, se utiliza la ecuación de Arrhenius {10} y las energías de activación para la poli (DL-alanina) obtenidas por Englander y Poulsen (Englander & Poulsen, 1969).

2.- A fin de no variar el programa implementado, podemos suponer que las constantes catalíticas, k_H^+ y k_{OH^-} , son iguales a las de los péptidos modelos, y efectuar la corrección debida a la secuencia no con los parámetros tabulados de péptidos modelo de Molday (Molday et al., 1972) sino con otros procedentes de las medidas experimentales (Robertson & Baldwin, 1991). Este procedimiento resulta más sencillo de aplicar.

Ambos procedimientos proporcionaron resultados muy similares.

Al introducir los valores de Robertson y Baldwin como factores correctores en cada aminoácido a cada uno de los pHs y temperaturas, se ha podido observar que las medidas resultan más homogéneas, aparecen menos dispersas que si se usaran siempre los valores de Molday. En las Figs. III.4, III.8 y III.10 aparecen los primeros como triángulos y los segundos como círculos. Con las k_c obtenidas, aplicando {7a} se obtienen las ΔG_{op} que se podrán comparar con los valores termodinámicos. Estas nuevas constantes intrínsecas fueron las que se emplearon también para la Ribonucleasa S, suponiendo en buena aproximación que ambas tenían el mismo estado desnaturalizado.

A partir de las k_{ex} podemos determinar también los parámetros cinéticos, por las expresiones {11}, {12} y {14} que caracterizan la teoría del estado de transición y obtener conclusiones acerca de la mayor o menor estabilidad del estado parcialmente desnaturalizado.

3.2.6. LAS MEDIDAS CALORIMÉTRICAS.

Las medidas calorimétricas se realizaron en un microcalorímetro Microcal MC1-OSC (Microcal Inc. Northampton, MA). La velocidad de barrido fue de 60° C/h para el pH = 6.0 (en las dos proteínas, Ribonucleasa A y Ribonucleasa S) y de 10° C/h para el pH = 2.5. Antes de proceder a la introducción de las muestras en el calorímetro se dializaron durante 12 horas en el tampón en que se habían preparado a fin de conseguir una buena homogenización. Este tampón de dializado se empleó para construir la línea base. Las concentraciones de enzima estaban en el rango de 1.5 a 3.0 mg/ml. Para la adquisición y tratamiento de los datos se usó el programa Dynap.

A partir de los valores medidos del calor de transición, ΔH_m , la temperatura media de desnaturalización térmica, T_m y de la diferencia entre los calores específicos en la forma nativa y desnaturalizada, ΔC_p , se calcula la energía libre ΔG_u y entalpía ΔH_u de desnaturalización térmica a cualquier temperatura, según las siguientes expresiones (Privaov, 1979):

$$\Delta G_u = \Delta H_m \left(1 - \frac{T}{T_m} \right) - \Delta C_p \left[T_m - T + T \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \right] \quad \{17\}$$

$$\Delta H_u = \Delta H_m - \Delta C_p (T_m - T) \quad \{18\}$$

3.3. RESULTADOS.

En lo que sigue se dan los resultados obtenidos para las medidas de las constantes cinéticas de Ribonucleasa A y Ribonucleasa S a distintos pHs y temperaturas. Estos resultados se ilustran dentro del texto del trabajo, como representaciones gráficas de los factores de protección, K_p , en función del número de residuo en la secuencia de la proteína. En el otro eje de ordenadas se representa la energía libre correspondiente al equilibrio de fluctuación local que hace posible el intercambio.

En estas representaciones gráficas, los factores de protección y energías libres aparecen comprendidas entre dos límites superior e inferior. El superior lo imponen los protones peptídicos fuertemente protegidos y la limitación viene dada por los tiempos excesivamente largos de medida (meses a años). El inferior corresponde a los protones de intercambio rápido y la limitación la impone en este caso el tiempo transcurrido entre la preparación de la muestra y la finalización del primer experimento COSY. La posición de los límites superior e inferior se determinó con base en una evaluación de un 10 % en el error de medida de los volúmenes de las correlaciones COSY. Para el límite superior se admitió un 10 % de disminución en dicho volumen en el tiempo de intercambio máximo y para el límite inferior se admitió la existencia de un 10 % de intensidad residual al final del tiempo de intercambio (Pedersen et al., 1991)

En estas representaciones figura también una evaluación de la energía libre del proceso de desnaturalización obtenido por extrapolación a la temperatura correspondiente de los valores de T_m , ΔH_m e ΔC_p correspondientes al cambio de fase. Como puede observarse la energía libre de desnaturalización evaluada a partir de datos calorimétricos es siempre menor que la obtenida a partir de datos del intercambio.

Las constantes cinéticas de algunos protones peptídicos no pudieron medirse con fiabilidad en todos los casos debido a distintas causas. Una de ellas es la relativa a aquellos protones cuya constante de acoplamiento con el NH del propio residuo, $^3J_{\alpha\text{NH}}$, es muy pequeña (menor o igual a 5 Hz), como ocurre en los residuos Phe 8, Tyr 25, Ser 32, Glu 86 y Tyr 92, en cuyo caso la señal de correlación COSY muestra una intensidad muy baja incluso para un 100 % de población protónica. Otra de las causas que interfieren en una correcta medida de las k_{ex} , es la del solapamiento de la correlación COSY con otra correlación en la que esté involucrado un protón más protegido, como es el caso de Gln 28 vs Ala 56, Arg 33 vs Gln 60, Asn 44 vs Lys 104, Asn 94 vs Asn 71, Ser 75 vs Ala 102, Tyr 76 vs Glu 111 e Ile 107 vs Cys 110 (en Ribonucleasa S coinciden Glu 86 y Val 124). Las correlaciones COSY que involucran un protón H_{α} con desplazamiento químico en la proximidades del disolvente (aproximadamente 4.70 ppm) también se ven normalmente afectadas por problemas de saturación de niveles de espín o por oclusión de las correspondientes señales por ruido t_1 . En este caso se encuentran las señales de los protones correspondientes a los residuos Asn 34, Leu 35, Ser 75, Tyr 76 y Glu 111, aunque podrá ocurrir con algunos más porque la señal del disolvente varía ligeramente con la temperatura. Por último a pH = 6.0 en la Ribonucleasa A, nos situamos en el punto medio del equilibrio de ionización del grupo imidazol de His 48, un equilibrio lento en la escala de tiempos de la RMN, que provoca ensanchamientos muy notables de las correlaciones COSY (llegando incluso a desaparecer) y consecuentemente grandes errores en la medida correspondiente de los residuos afectados, que son los siguientes: Phe 46, Val 47, His 48, Ser 80, Ile 81, Thr 82 y Asp 83. En Ribonucleasa S no se observa este ensanchamiento de las señales y las k_{ex} de estos residuos pueden medirse normalmente. Todos los protones afectados están marcados con un asterisco en la correspondiente figura.

De las medidas de constantes cinéticas realizadas para Ribonucleasa A a pH = 2.5 y pH = 6.0, y para Ribonucleasa S a pH = 6.0 se deduce que el mecanismo de intercambio corresponde al límite EX₂ en el que $k_f \gg k_c$, es decir, la cinética de vuelta al estado nativo es mucho más rápida que la del intercambio intrínseco. En un mecanismo EX₁ en el que sucedería todo lo contrario $k_c \gg k_f$, es decir, siempre que se crea un estado abierto, el protón peptídico intercambia, habría que esperar una homogenización de las cinéticas de intercambio de los distintos protones y una independencia de su valor respecto al pH. En nuestro caso, no se observa tal homogenización y las cinéticas de intercambio son consistentemente mayores a pHs altos, características ambas del mecanismo EX₂.

3.3.1. INTERCAMBIO DE RIBONUCLEASA A A PH = 2.5.

Constantes cinéticas de intercambio, factores de protección y energías libres de fluctuación global y local.

En la Fig. III.4. se resumen los resultados de las medidas de las constantes cinéticas de intercambio y magnitudes derivadas de ellas en función de la secuencia de aminoácidos para las tres temperaturas estudiadas: 288 K, 298 K y 308 K.

En general, podemos dividir, a grosso modo, los 119 protones peptídicos de la Ribonucleasa A en tres grandes grupos de acuerdo a sus propiedades de intercambio: lentos, intermedios y rápidos. A la temperatura intermedia de 298 K, a este pH los tres grupos están homogéneamente poblados con aproximadamente 40 protones cada uno de ellos. Para los más lentos la intensidad de las señales COSY no disminuye a lo largo de las horas en que se permite el intercambio. Por el contrario para los más rápidos, la intensidad ha decaído por completo al finalizar el primer experimento. Los límites en los factores de protección se sitúan en torno a 4.5-3.8 para el superior y 0.8-0.2 para el inferior y los correspondientes a las energías libres de fluctuación conformacional local entre 6.0-5.5 Kcal mol⁻¹ y 1.0-0.2 Kcal mol⁻¹, respectivamente. Los protones de intercambio más lento para cada temperatura marcan el límite mínimo para el valor de la energía libre del proceso de desnaturalización global del enzima. En el otro extremo para los protones peptídicos de intercambio rápido la diferencia de energía libre entre las formas abierta y cerrada es menor de 1.0 Kcal mol⁻¹, es decir, son prácticamente isoenergéticas e intercambiarían, pues, con una constante cinética cercana a la constante intrínseca, k_c . Los protones de intercambio intermedio necesitan de fluctuaciones conformacionales locales definidas por diferencias de energías libres entre las formas abierta y cerrada correspondientes entre 1 y 6 Kcal mol⁻¹.

Relación de las propiedades de intercambio con rasgos estructurales generales. Enlace de hidrógeno y accesibilidad.

Una primera correlación de las propiedades de intercambio de los protones peptídicos individuales con rasgos estructurales de la proteína es inmediata. Así los aproximadamente 40 protones de intercambio rápido no se encuentran en general involucrados en enlaces de hidrógeno y pertenecen a alguna de estas regiones: (a) zonas no estructuradas (lazos ó vueltas β), (b) segmentos iniciales de hélices α , (c) deformaciones en la láminas β ó (d) hebras β externas. En el extremo opuesto, aproximadamente 40 protones peptídicos aparecen fuertemente protegidos a 288 K y 298 K. Todos ellos, salvo algún caso individual, están involucrados en enlaces de hidrógeno.

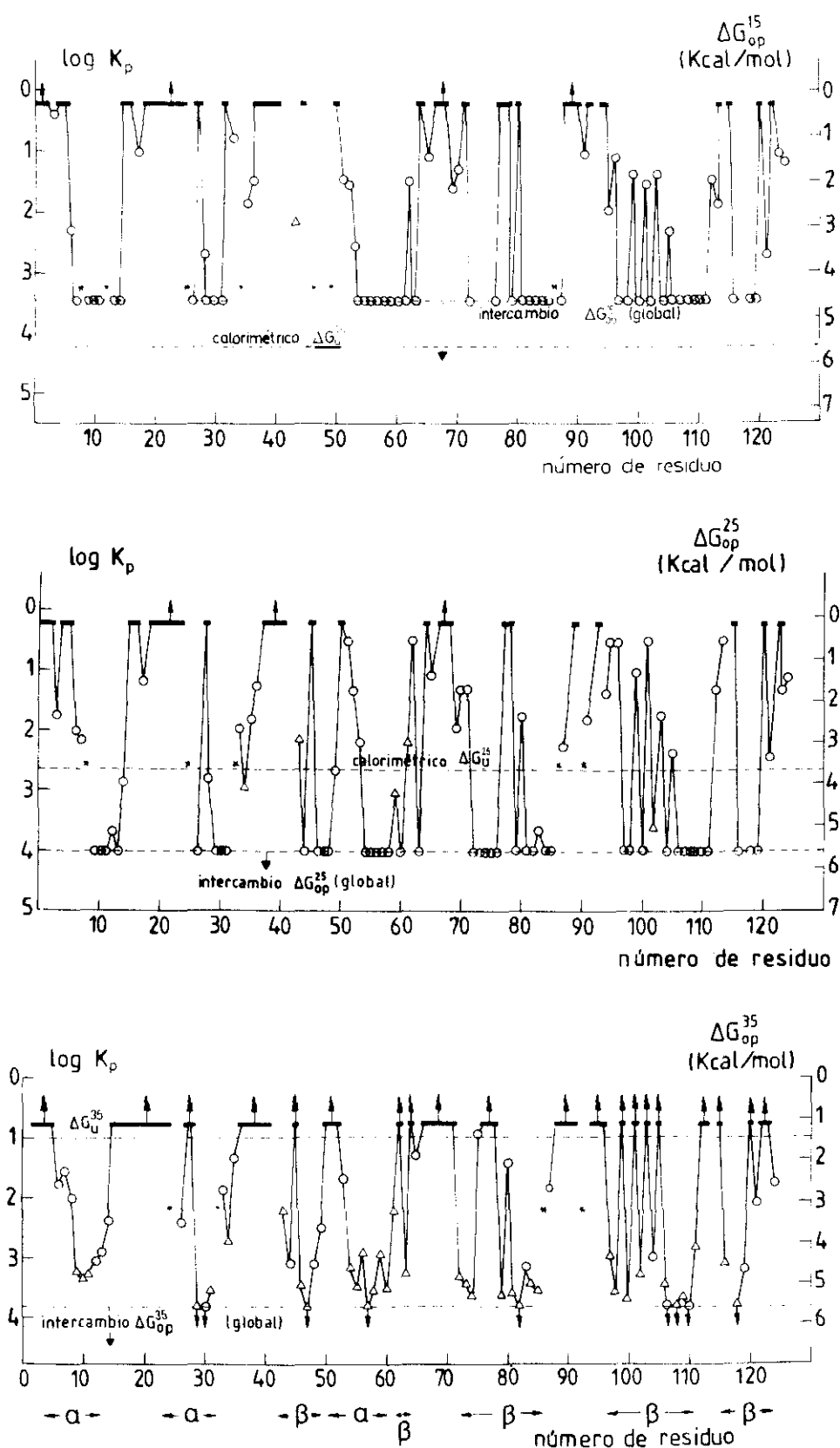


Fig. III.4 : Comportamiento dinámico de Ribonucleasa A a pH = 2.5 (tampón de glicina) y 0.2 M de NaCl.

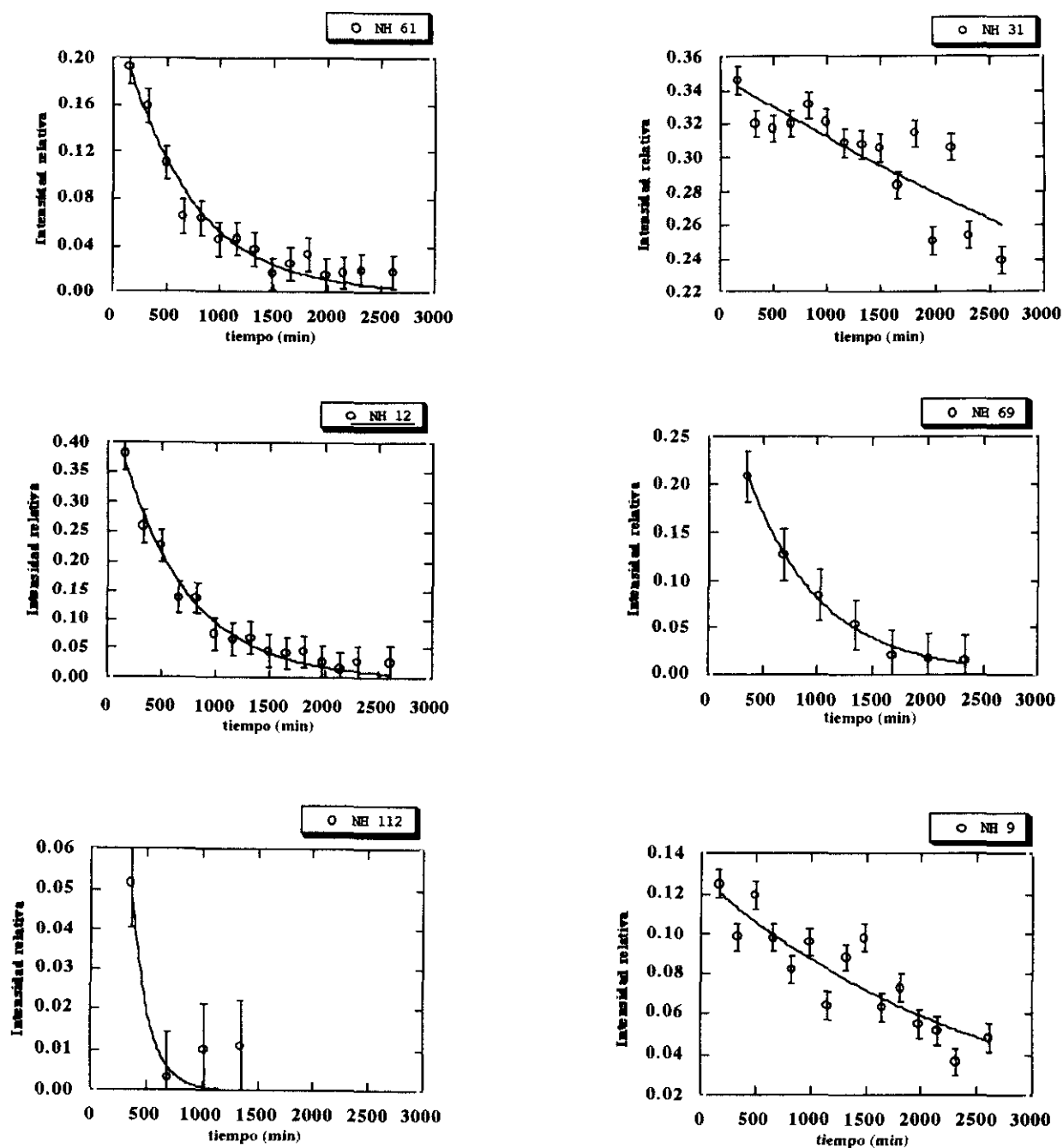


Fig III.5 : Gráficas representando la caída de la intensidad de las señales de los protones frente al tiempo, para diversos residuos implicados en los diferentes tipos de estructura secundaria de la proteína. Condiciones $\text{pH} = 2.5$ y 0.2 M de NaCl .

y pertenecen a extremos C-terminales de hélices α ó regiones internas de láminas β . A 308 K sólo siete de entre estos protones consevan el 100 % de protección protónica. A 313 K nos encontramos en la temperatura media del cambio de fase.

Como se apuntaba en la introducción, la naturaleza del tipo de fluctuación necesaria para que se produzca el intercambio es todavía materia de discusión (Englander & Kallenbach, 1984). La adopción de uno u otro tipo de fluctuación depende del modelo de

Tabla III.3

Distribución de los protones peptídicos de acuerdo con sus propiedades de intercambio y de su involucración ó no en enlaces de hidrógeno de diferentes tipos en Ribonucleasa

A. Condiciones: pH = 2.5 (tampón de glicina) y 0.2 M de NaCl.

Tipo de intercambio	T (K)	Lámina β	Hélice α	Cadena principal	Cadena lateral	Sin enlace de hidrógeno
Lento	288	28	13	0	4	2
	298	25	2	0	4	1
	308	4	3	0	0	0
Intermedio	288	3	2	4	3	15
	298	8	5	5	4	8
	308	26	15	4	5	6
Rápido	288	0	1	1	5	29
	298	0	1	1	4	27
	308	1	1	2	7	39
No medidos	288	3	5	1	0	0
	298	1	3	0	0	0
	308	3	2	0	0	1
Total		34	21	6	12	46
Total			119			

intercambio y más concretamente de la aceptación de cual es el origen más importante de la protección frente al intercambio: la involucración del protón peptídico en un enlace de hidrógeno o la inaccesibilidad del disolvente y de los catalizadores (H^+ y OH^-) a la posición que ocupa dicho protón en el interior de la proteína. Parece pues, pertinente analizar qué nos dicen acerca de este problema las constantes de intercambio medidas aquí para la Ribonucleasa. En la Fig. I.7 se representa un esquema de la estructura secundaria

de la Ribonucleasa en la que aparecen señalados los enlaces de hidrógeno detectados en solución (Santoro et al., 1993). En la Tabla III.3 y III.4, se dan las distribuciones de protones peptídicos de acuerdo con sus propiedades de intercambio en función de su participación en enlaces de hidrógeno o de la accesibilidad del disolvente. Como puede verse en los dos casos existe una clara correlación entre las dos propiedades. Así los protones involucrados en enlaces de hidrógeno muestran en su gran mayoría un intercambio lento a temperaturas distantes (288 K y 298 K) de la del cambio de fase (313 K) mientras que los que no están involucrados en puentes de hidrógeno, presentan un intercambio rápido o en todo caso intermedio. Del mismo modo los protones inaccesibles (Lee & Richards, 1971; tanto por ciento de la superficie del protón peptídico expuesta al disolvente igual a cero) muestran un intercambio lento y los accesibles un intercambio rápido.

Las dos correlaciones obtenidas no son, sin embargo independientes, como se pone de manifiesto al verificar que de los 43 protones accesibles sólo los de Ser 80 y Glu 86 aparecen involucrados en enlaces de hidrógeno, mientras que de los 76 protones peptídicos inaccesibles al disolvente todos menos 12 (un 84 % del total) forman puentes de hidrógeno. Es decir, inaccesibilidad y participación en enlaces de hidrógeno son propiedades muy correlacionadas. Si consideramos sólo las excepciones encontramos: el protón peptídico de Glu 86 enlazado al carbonilo de Pro 42, aunque es muy difícil de medir en los experimentos COSY por su pequeña constante de acoplamiento, $^3J_{\alpha\text{NH}}$, presenta un intercambio lento a pesar de ser accesible; los protones de Lys 31 y Ser 59, inaccesibles y no enlazados por puentes de hidrógeno muestran también a 288 K intercambio lento, sugiriendo que tanto una propiedad como otra, cuando se dan aisladas pueden ralentizar el intercambio; en el extremo opuesto encontramos los protones peptídicos de Ser 50 y Ser 80, accesibles y ligados por puentes de hidrógeno a grupos aceptores de cadenas laterales ($-\text{COO}^-$ de Asp 53 y Glu 49, respectivamente) presentan un intercambio rápido al igual que los de Asn 24, Lys 41, Asn 71, Asn 94 y Ala 122 no enlazados por puentes de hidrógeno e inaccesibles al disolvente. Si aceptamos que los enlaces de hidrógeno en los que los grupos aceptores pertenecen a cadenas laterales no son tan efectivos como los del esqueleto en cuanto a ralentizar el intercambio (Wlodaver et al., 1984) nos podemos inclinar por esta última (enlaces de hidrógeno a grupos de la cadena principal) como la causa más importante de protección en términos relativos de los protones peptídicos frente al intercambio.

Tabla III.4

Distribución de los protones peptídicos de acuerdo con sus propiedades de intercambio y de la accesibilidad al disolvente a la posición protónica en Ribonucleasa A.

Condiciones: pH = 2.5 (tampón de glicina) y 0.2 M de NaCl.

Tipo de intercambio	T (K)	Inaccesibles	Accesibles
Lento	288	47	0
	298	42	0
	308	7	0
Intermedio	288	14	13
	298	26	4
	308	52	3
Rápido	288	8	28
	298	6	27
	308	13	38
No medidos	288	8	1
	298	3	1
	308	5	1
Total		77	42
Total		119	

Propiedades de intercambio y estructura secundaria.

En general, puede contrastarse que la estabilidad de las hélices es del mismo orden como se deduce de la Fig. III.4, que la de las láminas β , con la excepción quizás de la hélice I, correspondiente al extremo N-terminal ó S-peptido (residuos 3 al 13) que se presenta con una estabilidad menor. A 308 K, todos los protones peptídicos de dicha hélice presentan ya un comportamiento intermedio, mientras que en las hélices II (residuos 23 al 32) y III (residuos 51 al 60), se conservan todavía protones sin intercambiar con deuterones, como son Met 29 y Met 30 en la primera de ellas y la Val 57 en la segunda.

El comportamiento observado para las tres hélices es compatible en términos generales con lo que sucedería si consideramos a cada una de ellas como unidades

cooperativas de desnaturalización independientes. Estas *unidades cooperativas*, mediante las cuales se exponen al disolvente un número de residuos han sido descritas en varias proteínas (Englander & Kallenbach, 1984; Gooley et al., 1992). Hay que señalar que estas unidades locales se refiere a residuos que alcanzan el disolvente mediante un proceso cooperativo, al unísono, y con la misma K_{op} , y por tanto la misma energía, pero que eso no significa que residuos con la misma K_{op} intercambien al mismo tiempo (Skelton et al., 1992).

En el caso del S-péptido se observa un comportamiento dinámico compatible con lo predicho por los modelos de Zimm y Bragg (Zimm & Bragg, 1959) ó Lifson y Roig (Lifson & Roig, 1961) para la transición *hélice*-"*random-coil*" en oligopéptidos. Los factores de protección frente al intercambio relacionados directamente con las conformaciones locales en las que el protón considerado está involucrado en una vuelta de hélice, van disminuyendo gradualmente hacia los extremos de la hélice y en especial hacia el extremo N-terminal. Este fenómeno conocido en la literatura anglosajona como *fraying effect* (deshilachamiento) es debido a la cooperatividad en la formación de la hélice y ha sido observado previamente, también a partir de datos de intercambio H/D en esta misma hélice en la Ribonucleasa S (Kuwajima & Baldwin, 1983 b), en la hélice central del inhibidor seminal de tripsina (BUSI IIA) (Wüthrich et al., 1984) y en el citocromo c (Wand et al., 1985).

El descenso en los factores de protección (o de las energías libres correspondientes) a partir de la parte central de las hélices es mucho más grande que el encontrado en péptidos sintéticos, de lo que se deduce una estabilización adicional como consecuencia de la estructura terciaria de la proteína sobre las tres hélices.

En la hélice I, los residuos Glu 9, Arg 10, Gln 11, His 12 y Met 13 aparecen como los más protegidos con un factor de protección aproximadamente igual. Los protones pertenecientes a estos residuos muestran efectos NOE con protones de residuos muy lejanos en la secuencia, concretamente con los segmentos: Arg 33-Leu 35 y Asn 44-Val 47, y con la Leu 51, Val 54 y Phe 120. La estabilidad adicional puede pues provenir de efectos hidrofóbicos entre las cadenas laterales voluminosas de los residuos de la hélice I y los del interior de la proteína.

Igualmente en la hélice III las cadenas laterales de los residuos Met 29 y Met 30, presentan efectos NOE con los protones de cadenas laterales de residuos pertenecientes a la bolsa hidrofóbica Asp 14-Tyr 25-His 48. Por último, resonancias protónicas de la cadena lateral de Val 57 en la hélice III están correlacionadas por efectos NOE con las señales protónicas de los residuos Ser 75 y Val 108 pertenecientes a la segunda lámina β , sugiriendo un punto de anclaje también hidrofóbico, de la hélice a la lámina. Ejemplos

similares de interdigitización de cadenas laterales voluminosas de hélices con otras cadenas laterales en la interfase hélice-proteína se han descrito para las proteínas citadas más arriba y en estudios de difracción de neutrones en estado cristalino en mioglobina (Schonborn, 1985) y en tripsina (Kosiakoff, 1982).

La existencia de unidades cooperativas de desnaturalización, tal como parece deducirse del comportamiento de las tres hélices, favorecen el modelo de intercambio H/D en proteínas, que propugna al enlace de hidrógeno como el origen principal de la ralentización del intercambio.

Los protones peptídicos Thr 3 y Ala 6 en la hélice I y los de Leu 51, Ala 52 y Asp 53 en la hélice III presentan una ralentización en su intercambio suficiente como para ser clasificados como protones de intercambio intermedio. De ellos sólo el de Ala 6 está enlazado por puente de hidrógeno al oxígeno del grupo hidroxilo de Thr 3, lo que puede constituir el origen de su intercambio lento. Para los protones peptídicos de Thr 3 y los de Leu 51, Ala 52 y Asp 53 todos ellos en el extremo N-terminal de las hélices α , existe una posible causa común para la ralentización de su intercambio que es el efecto, discutido en la introducción, de la O-protonación en el oxígeno del carbonilo pues en todos estos residuos su grupo carbonilo está involucrado como aceptor en un puente de hidrógeno con el protón peptídico NH_{i+3} del residuo correspondiente.

Junto con los descritos en las hélices I, II y III los protones peptídicos más resistentes al intercambio a este pH de 2.5 son los que forman parte de la láminas β . La primera lámina formada por las hebras β_1 , β_4 y β_5 en disposición antiparalela, involucra como protones NH internos enlazados a grupos CO de las hebras paralelas, a los de los residuos Asn 44-Phe 46-His48 (hebra β_1), Met 79-Ile 81-Thr 82-Asp 83-Cys 84-Arg 85-Glu 86 (hebra β_4 y hebra interior) y Lys 98-Thr 100-Ala 102 y Lys 104 (hebra β_5 que es la más externa). La segunda lámina está formada por las cuatro hebras antiparalelas: β_2 , β_3 , β_6 y β_7 quedando fuertemente protegidos los protones internos a la lámina, que son Val 63 en β_2 , Cys 72, Tyr 73 y Gln 74 en β_3 , Ile 106, Ile 107, Val 108, Ala 109, Cys 110 y Glu 111 en β_6 y Val 116, Val 118 e His 119 en β_7 . El alto factor de protección frente al intercambio que muestran gran parte de estos protones requieren una desnaturalización global de tipo cooperativo de toda la molécula. Si atendemos a la estructura fina de los factores de protección, los núcleos más resistentes al intercambio estarían centrados: (a) en torno a la bolsa hidrofóbica Asp 14-Tyr 25-His 48 que incluiría a Val 47 y Thr 82 junto con Met 29 y Met 30 en la hélice II y (b) en la segunda lámina, incluyendo los protones peptídicos de Ile 106, Val 108, Ala 109 y Val 118, que incorporaría además a Val 57, "punto de anclaje" de la hélice II sobre esta lámina. La estructura fina observada en las láminas es compatible con un proceso de desna-

turalización cooperativo de enlaces de hidrógeno contiguos (véase por ejemplo en la Fig. III.6, los "hexaciclos" correspondientes a los residuos entre Met 79-Lys 104 ó Arg 85-Lys 98) que comenzase por los más externos y se propagase hacia el centro de la lámina. Este proceso no parece producirse por hebras independientes, sino de forma cooperativa destruyéndose toda la primera lámina, si bien la pareja Phe 46-Thr 82 aparece como el núcleo final más resistente. En la segunda lámina este proceso escalonado no es tan aparente salvo la estructura final más estable que corresponde al entramado de enlaces de hidrógeno que implica a los residuos Ala 109, Val 118 e His 119.

Los protones peptídicos de residuos pertenecientes a hebras exteriores de láminas β que se dirigen hacia el disolvente muestran intercambio rápido a 308 K y en general intercambio intermedio a 298 K y 288 K. Así sucede con los NHs de Asn 62, Thr 99, Gln 101, Asn 103, His 105 y Ser 123. Todos ellos son accesibles al disolvente y no están involucrados en enlaces de hidrógeno ni los propios protones peptídicos ni sus correspondientes grupos CO. La causa de la ralentización a las temperaturas más bajas habría que buscarla probablemente en los valores evaluados en las constantes intrínsecas, k_c . Lo mismo sucede con el protón peptídico de la Val 43, cuyo intercambio aparece ralentizado incluso a 308 K.

La gran mayoría de los protones peptídicos pertenecientes a segmentos sin estructura secundaria definida intercambian muy rápidamente. Algunos de ellos implicados en enlaces de hidrógeno tales como los de Thr 17, Leu 35, Cys 65, Gln 69, Cys 95 y Ala 96 muestran intercambio intermedio. Otros como los de Thr 36, Thr 70, Asn 71, Lys 91, Asn 94, Gly 112 y Asn 113 también con intercambio intermedio pueden deber su

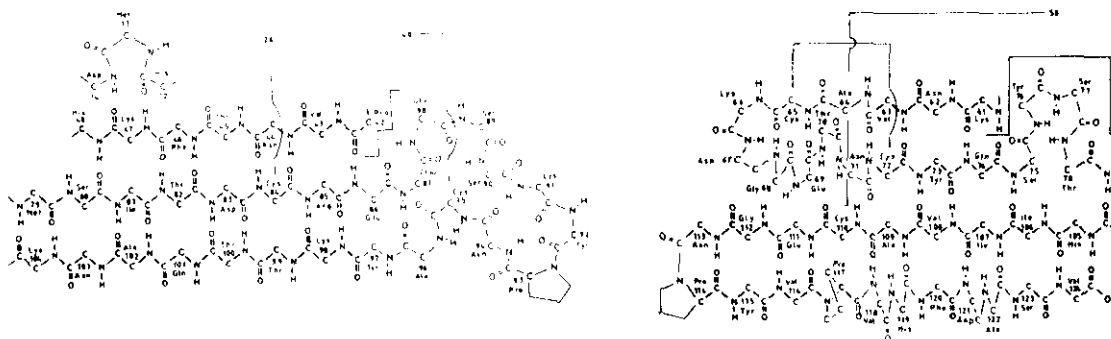


Fig. III.6.: Esquema de las dos láminas β en la estructura de Ribonucleasa A.

Tabla III.5

Comportamiento del intercambio de Ribonucleasa A (pH = 2.5 (tampón de glicina) y 0.2 M de NaCl). Se usa la nomenclatura IUPAC-IUB para nombrar los aminoácidos.

Unidades de desnaturalización	Condiciones de observación	Implicación en la estructura nativa	ΔG_{Op} (Kcal mol ⁻¹)
A96,T99,Q101 y N103	288 K	Hebra β_5	1.9
A102 y D83	298 K	Hebras β_4 y β_5	5.0
M79, I81, (D83)*, C84, R85, K98, T100, (A102)* e I106	308 K	Hebras β_4 , β_5 y β_6	4.9
V63, C72, Y73, Q74, A109, E111, V116 e H119	308 K	Hebras β_2 , β_3 , β_6 y β_7	4.9
A56 ⁺ y S59	308 K	Hélice α III	4.2
V54, Q55, C58 y Q60	308 K	Hélice α III	4.9
E9, R10, Q11 e H12	308 K	Hélice α I	4.6
G112 y N113	288 K	Giro β III	2.2
C65, Q69, T70 y (N71) [#]	288 K (y 298 K)	Giro β I	1.9
T87, (K91) [#] y N94	308 K (y 298 K)	Giro β II	2.5 (y 1.4)
S123 y V124	288 K y 298 K	Hebra β_7	1.4

* Indica un aminoácido que ha sido incorporado ya a otra unidad de desplegamiento medida en otras condiciones diferentes de las indicadas.

[#] Indica un aminoácido que no se observa en las condiciones indicadas por efecto de la señal residual del H₂O, pero que está presente en la temperatura indicada en el paréntesis.

⁺ Señales cuya constante posee gran incertidumbre, al producirse un solapamiento de su pico COSY con otra u otras señales (en el caso de Ala 56, existe un solapamiento para todas las temperaturas con Gln 28).

protección a la proximidad de los puentes disulfuro Cys 40-Cys 95, Cys 58-Cys 110 y Cys 65-Cys72 en el estado desnaturalizado. El protón peptídico de Gly 68, aunque forma enlace de hidrógeno con el CO de Cys 65, presenta un intercambio rápido. El segmento Lys 66-Asn 71 muestra una gran movilidad, según puede deducirse del número e intensidad de los efectos NOE observados. La energía libre entre las formas cerrada y abierta debe ser muy pequeña, de forma que el intercambio H/D aparezca como rápido.

En la Fig. III.5 aparecen representados las señales de decaimiento de protones implicados en diferentes tipos de estructura.

En la Tabla III.5 se resume el comportamiento frente al intercambio de los protones peptídicos de Ribonucleasa A a pH = 2.5, clasificados como unidades de desnaturalización cooperativa. Se incluyen en dicha Tabla las energías libres entre los estados nativo y el "estado abierto" entendiendo como tal el que permite el contacto con el disolvente y posterior intercambio. Dicha Tabla contiene pues los elementos necesarios para una descripción detallada en términos energéticos y estructurales de la dinámica de la Ribonucleasa a pH = 2.5.

Parámetros de activación

Los parámetros de activación correspondientes al estado de transición para el proceso de intercambio H/D entre la forma nativa y el estado abierto se han obtenido únicamente para aquellos protones peptídicos con constantes cinéticas accesibles a

Tabla III.6

Parámetros cinéticos calculados para Ribonucleasa A. Entre paréntesis se indican las estimaciones de los errores; en los restantes esta estimación es del 25 %. Condiciones: pH = 2.5 (tampón de glicina) y 0.2 M de NaCl.

Residuo	ΔH^\ddagger (Kcal mol ⁻¹)(1)	ΔH^\ddagger (Kcal mol ⁻¹)(2)	ΔS^\ddagger (Cal mol ⁻¹ K ⁻¹) (3)	ΔS^\ddagger (Cal mol ⁻¹ K ⁻¹) (2)	ΔH_{op} (Kcal mol ⁻¹)(4)
Ala 6	26.4	25.4	9 (± 0.3)	5.7	9.4
Leu 35	25.6	24.4	8.2 (± 0.5)	4.4	8.6
Val 43	15.1	14.2	-30.5 (± 1.2)	-34.2	-1.9
Asp 53	33.1	33.7	32.7 (± 0.12)	34.9	16.1
Cys 65	12.1	10.7	-35.7 (± 0.4)	-40.3	-4.9

(1) Calculados a partir de la representación de Arrhenius.

(2) Calculados a partir de la representación de $\Delta G^\ddagger/T$ versus $1/T$.

(3) Calculados a partir de la expresión termodinámica de ΔG^\ddagger {12}, y tomando una media aritmética de los tres valores obtenidos.

(4) Obtenido a partir de {15} haciendo uso del ΔH^\ddagger obtenido en las representaciones de Arrhenius, y tomando en los cálculos $\Delta H^\ddagger_{kc} = 17$ Kcal mol⁻¹ (Englander & Poulsen, 1969).

nuestras medidas a las tres temperaturas: 288 K, 298 K y 308 K a este pH = 2.5. Los resultados correspondientes se dan en la Tabla III.6. Como se ha expuesto en la introducción (apartado 3.1.2) es posible obtener valores de ΔH^\ddagger a partir de los valores de k_{ex} a diferentes temperaturas, de acuerdo con {10} ó bien de {12} en el supuesto de que ΔH^\ddagger no dependa de T; las gráficas de Arrhenius aparecen en la Fig. III.7. y las de $\Delta G^\ddagger/T$ versus $1/T$ en la Fig III.8.

Los valores de ΔG^\ddagger calculados a partir de {12}, corresponden a la suma de la energía libre del proceso de activación del intercambio, ΔG^\ddagger_{kc} , y la energía libre termodinámica del equilibrio de apertura, ΔG_{op} . Para la primera es posible calcular un valor a partir de los de ΔH^\ddagger e ΔS^\ddagger obtenidos para la poli (DL-alanina) (Englander & Poulsen, 1969). Si aceptamos estos valores ($\Delta H^\ddagger = 17 \text{ Kcal mol}^{-1}$ e $\Delta S^\ddagger = 27 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) los correspondientes ΔG_{op} para los residuos en la Tabla III están comprendidos entre 12 y 14 Kcal mol⁻¹ mucho mayores que los evaluados por {7a}. Ello es indicativo de que los parámetros de activación de intercambio correspondientes a poli (DL-alanina) en el estado "random-coil", y por tanto para protones totalmente accesibles, no son aplicables a las formas abiertas de proteínas en las que ha de dejarse sentir la influencia de estructuras residuales en torno a los protones considerados. Si aceptamos los valores de ΔG_{op} calculados con {7a} para estos residuos (Fig. III.4) es posible calcular por separado las contribuciones a los valores totales de ΔH^\ddagger e ΔS^\ddagger de las correspondientes k_c al proceso de activación de intercambio en el estado abierto ΔH^\ddagger_{kc} e ΔS^\ddagger_{kc} y los de equilibrio entre las formas cerrada y abierta ΔH_{op} e ΔS_{op} , respectivamente. Respecto a los primeros se observa que ΔH^\ddagger_{kc} está comprendido entre 15 y 24 Kcal mol⁻¹ e ΔS^\ddagger_{kc}

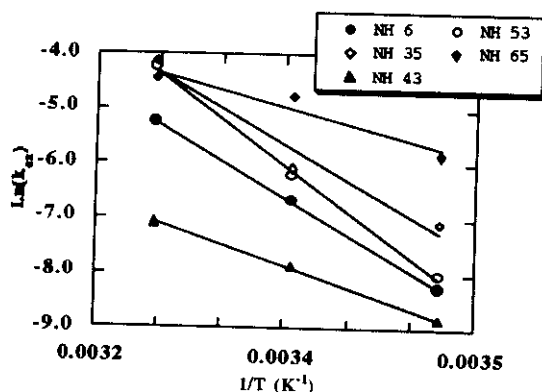


Fig. III.7. : Gráficas de Arrhenius para la Ribonucleasa A a pH = 2.5 (tampón de glicina) y 0.2 M de NaCl .

entre -15 y $14 \text{ Cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. En el intervalo encontrado para la entalpía de activación se incluye el valor aceptado (Englander & Poulsen, 1969) para el "random-coil" ($\Delta H^\ddagger = 17 \text{ Kcal mol}^{-1}$) lo que no sucede con ΔS^\ddagger , para el que se obtiene en la mayoría de los casos un valor de signo contrario. De ello hay que concluir pues, que en los estados abiertos de proteínas, que a diferencia de la poli (DL-alanina) contienen residuos con cadenas laterales de mayor tamaño y que en general muestran una estructura residual, la entropía de activación del estado de transición para el proceso de intercambio es menor que en la forma nativa. Este hecho puede tener su origen en la ordenación del disolvente en torno a cadenas laterales hidrofóbicas momentáneamente expuestas a él.

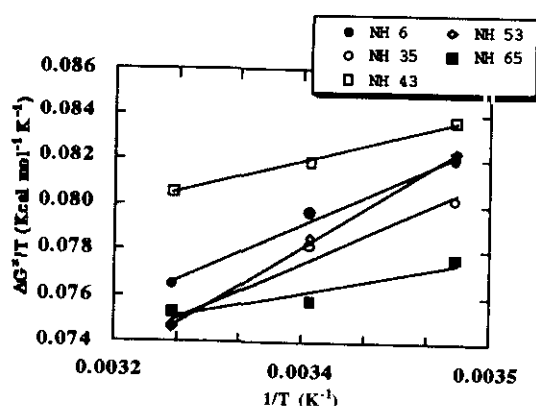


Fig. III.8. : Gráficas de $\Delta G^\ddagger/T$ versus $1/T$ de la Ribonucleasa A ($\text{pH} = 2.5$ (tampón de glicina) y 0.2 M de NaCl) para los protones con medidas cinéticas a varias temperaturas. La pendiente (ΔH^\ddagger) y la ordenada en el origen (ΔS^\ddagger), están en la Tabla III.6.

La entalpía y entropía de los equilibrios de fluctuación conformacional de apertura están fuertemente correlacionados. Ala 6, Leu 35 y Asp 53 por un lado, y Val 43 y Cys 65 por otro, presentan sin embargo comportamientos diferentes. Los primeros se ajustan mejor a un proceso convencional de desnaturalización local, mientras que en los últimos residuos el comportamiento es anómalo. Los errores en estos valores y sus fuertes correlaciones no aconsejan mayores especulaciones en cuanto a los orígenes de la anomalía. En todos los casos los valores de ΔH_{op} están muy lejos del valor correspondiente a la desnaturalización global por lo que el intercambio en estos residuos tiene lugar a partir de fluctuaciones conformacionales muy localizadas, que no dependen de la temperatura (Wagner, 1983).

3.2. INTERCAMBIO DE RIBONUCLEASA A A pH = 6.0.

Constantes cinéticas de intercambio, factores de protección y energías libres de fluctuación global y local.

A este pH se realizaron medidas experimentales siguiendo los tres procedimientos indicados en el apartado 2.1. El primero de ellos, que requiere la liofilización de la muestra, fue desechado al constatar que proporcionaba resultados contradictorios ya advertidos en otros casos (Oppenheimer, N. J., 1989; Hvidt & Nielsen, 1966). El grueso de las medidas se realizó por el segundo procedimiento, que proporcionó los mejores índices de consistencia y reproducibilidad. El tercer procedimiento sólo se usó para registrar los datos a 313 K, para poder evaluar las ΔG_{op} y compararlas con las de la Ribonucleasa S.

En la Fig. III.9 se resumen los resultados de las medidas de constantes cinéticas de intercambio y magnitudes derivadas de ellos en función de la secuencia de aminoácidos para las cuatro temperaturas estudiadas, que en este caso son: 288 K, 298 K, 308 K y 313 K. En la Fig III.10 se muestran las curvas de intensidad versus tiempo para diferentes protones.

A este pH la proteína es más estable que a pH = 2.5, como puede verse al comparar los valores máximos de ΔG_{op} ó sus equivalentes los factores de protección frente al intercambio. Ello es consecuencia de la acumulación de cargas positivas que se produce a pHs bajos, un factor desestabilizante bien conocido en proteínas globulares (Pace et al., 1990). Al ser la proteína más estable a pH = 6.0, la población del estado desnaturalizado en equilibrio con la del nativo y por tanto K_{op} serán mucho menores que a pHs más ácidos. Esto se compensa en parte por el valor mucho mayor que adquiere k_c por efecto de la más alta concentración de los iones OH^- que actúan como catalizadores. El resultado es que los valores de k_{ex} son a pH = 6.0 mayores que a pH = 2.5, pero incluidas todavía en el intervalo de medidas accesible.

Relación de las propiedades de intercambio con rasgos estructurales.

A la temperatura más baja (298 K) en que se han medido las constantes cinéticas de intercambio a este pH, todos los protones de intercambio lento (en número de 21) y todos los de intercambio intermedio (que son 14), con excepción del de la Val 43, son protones involucrados en enlaces de hidrógeno, y a la vez inaccesibles al disolvente.

Las propiedades de intercambio H/D de los protones lentos e intermedios no sufren en general, variación con el pH y por ello su comportamiento a pH = 6.0 es análogo al de

pH = 2.5. En general los protones más resistentes al intercambio se encuentran situados claramente en elementos bien definidos de estructura secundaria y, concretamente, en las dos láminas β y en las tres hélices α .

Si consideramos las propiedades de intercambio de menor a mayor temperatura (298 K a 318 K) observamos que las dos láminas β y la hélice III poseen la misma estabilidad, pudiéndose concluir que para el intercambio de los protones peptídicos involucrados en estos elementos, es necesario un proceso global cooperativo de desnaturalización. Las hélices I y II, en este orden, requieren energías de fluctuación conformacional relativamente menores, aunque no muy lejanas al del proceso global. Es de destacar que en la hélice I, los protones peptídicos de Gln 11, His 12 y Met 13, exceptuando His 12 a 298 K que puede venir afectado el valor de la constante cinética de intercambio por su pK_a , muestran a las demás temperaturas, valores homogéneos para el factor de protección, mientras que el de los residuos contiguos decae muy rápidamente. Estos hechos pueden explicarse de dos formas: (a) en el estado nativo las cadenas laterales de los residuos Gln 11, His 12 y Met 13 participan en interacciones con el resto de la proteína, que hacen a este segmento especialmente estable en condiciones nativas (y por tanto, lo que estamos observando no es más que el comportamiento dinámico de la hélice, como se ha descrito en el apartado 3.3.1) ó bien (b) en el estado abierto dichos protones se encuentran protegidos por una reordenación de enlaces de hidrógeno.

En la hélice III, este mismo hecho se produce con la Met 30, cuyo protón peptídico se encuentre asimismo fuertemente protegido frente al intercambio. Nuevamente es en la tercera hélice donde se encuentran protones peptídicos con protección máxima (comparable a la de la correspondiente a las láminas β). El segmento Val 54-Cys 58 (con excepción de la Ala 56) presenta valores de protección muy homogéneos. Los protones peptídicos de Ala 56 y Ser 59 son bastante menores, lo que puede estar relacionado con el mayor grado de exposición de estos residuos al disolvente. Estos resultados son compatibles con el hecho de que la hélice III (residuos Ser 50-Gln 60) constituyen una unidad cooperativa local de desnaturalización que requiere, para su paso a la forma abierta una energía menor, pero del mismo orden que la de desnaturalización global. El residuo Ala 56 y los iniciales y terminales de la hélice, gozarían de fluctuaciones más localizadas que constituirían una vía adicional para su intercambio H/D.

La primera lámina adolece de la presencia de la His 48, que muestra, como ya se comentó en el Capítulo II una protonación parcial a este pH, con lo que muchos de los protones peptídicos se pierden por ensanchamiento por intercambio lento entre las formas neutra y protonada. No obstante de los siete pares de residuos enfrentados en la lámina,

con formación mutua de enlaces de hidrógeno (véase Fig III.6), al menos en cinco de ellos (Asn 44-Cys 84, Met 79-Lys 104, Ile 81-Ala 102, Asp 83-Thr 100 y Arg 85-Lys

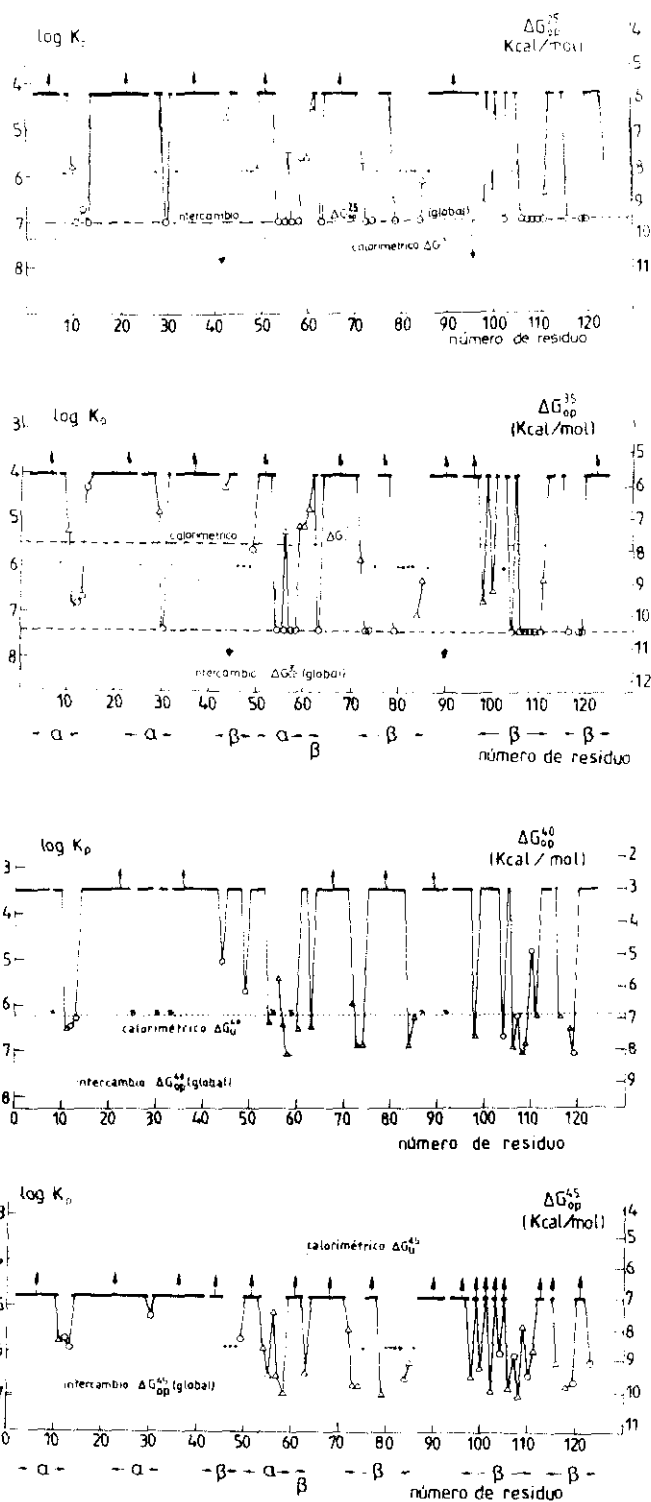


Fig. III.9. : Comportamiento dinámico de la Ribonucleasa A a pH = 6.0 (tampón fosfato) y 0.2 M de NaCl .

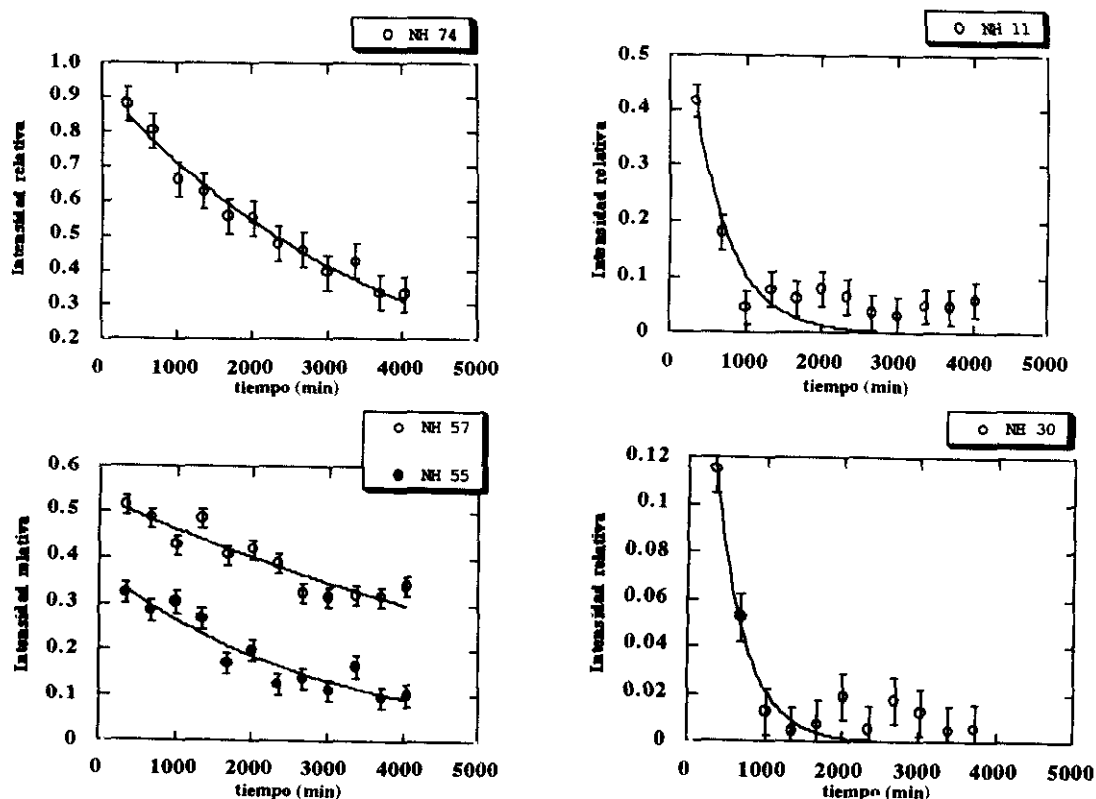


Fig III.10 : Gráficas representando la caída de la intensidad de las señales de los protones frente al tiempo, para diversos residuos implicados en los diferentes tipos de estructura secundaria de la proteína. Condiciones $pH = 6.0$ y $0.2 M$ de $NaCl$.

98) es posible detectar un protón peptídico de intercambio lento. Con excepción del NH de Asn 44, todos los demás pertenecen al grupo de máxima protección de la molécula y requieren por tanto una desnaturalización global para su intercambio con deuterio.

Todos los protones peptídicos implicados en puentes de hidrógeno en la segunda lámina, con excepción de los de Lys 61 y Cys 72, presentan factores de protección muy altos (entre 6 y 7 a la temperatura más alta examinada: 318 K) y muy homogéneos, señal inequívoca de que dicha lámina constituye una unidad de desnaturalización cooperativa y que requiere para el intercambio H/D de un proceso de desnaturalización global. Atendiendo a la estructura fina de los valores de protección, podría aceptarse la existencia de vías adicionales al intercambio que afectasen a los protones situados en los extremos de la lámina, tales como las excepciones citadas de Lys 61 y Cys 72 y los correspondientes a Cys 110, Glu 111 y Val 124.

Como en el caso correspondiente al $pH = 2.5$ en la Tabla III.7, se resumen las unidades cooperativas de desnaturalización, con su localización en la proteína y su descripción en términos de la estructura secundaria formada. Se incluye también el valor de ΔG_{op} . Esta Tabla constituye un resumen de la Dinámica de Ribonucleasa A, en condiciones nativas, en términos estructurales y energéticos.

Tabla III.7

Comportamiento del intercambio de Ribonucleasa A (pH = 6.0 (tampón de fosfato) y 0.2 M de NaCl). Se usa la nomenclatura IUPAC-IUB para nombrar los aminoácidos.

Unidades de desnaturalización	Condiciones de observación	Implicación en la estructura nativa	ΔG_{op} (Kcal mol ⁻¹)
T73, Q74, C84 [#] , K104, V108 y A109	313 K	Hebras β_3 , β_4 , β_5 y β_6	9.8
C84 y K98	313 K y 318 K	Hebras β_4 y β_5	9.6
R85 y T100	318 K	Hebras β_4 y β_5	9.0
M79, A102 e I106	318 K	Hebras β_4 , β_5 y β_6	10.0
S59 y Q60	298 K	Hélice α III	7.5
(V54)*, Q55, V57 y (C58)*	308 K y 318 K	Hélice α III	9.6
Q11, H12 y M13	308 K, 313 K y 318 K.	Hélice α I	9.8
(A109) [#] , C110, V118 e H119	308 K	Hebras β_6 y β_7 .	9.8

* Indica un aminoácido, que dependiendo de la temperatura, se incorpora o no a la unidad de desplegamiento.

Indica un aminoácido que ya ha sido incluido en otra unidad de desplegamiento.

Parámetros cinéticos

En la Tabla III.8 se pueden encontrar los aminoácidos para los cuales es posible calcular los parámetros cinéticos. En las Fig. III.11 y Fig. III.12 se encuentran las gráficas correspondientes.

La concordancia entre todos los valores de ΔH^\ddagger es muy buena. La única discrepancia radica en ΔS^\ddagger para la Cys 84, cuyos valores difieren en 10 Cal mol⁻¹K⁻¹, que puede explicarse con la incertidumbre en la determinación del término independiente de la recta de ΔG^\ddagger . El valor de ΔH_{op} es positivo para todos los valores encontrados, excepto el de Arg 85, pero que debido a su pequeño valor entra dentro del error experimental.

Tanto la Cys 84 como la Arg 85 pertenecen a una región de la primera lámina donde el intercambio tiene un comportamiento extraño (Robertson & Baldwin, 1991), por tanto

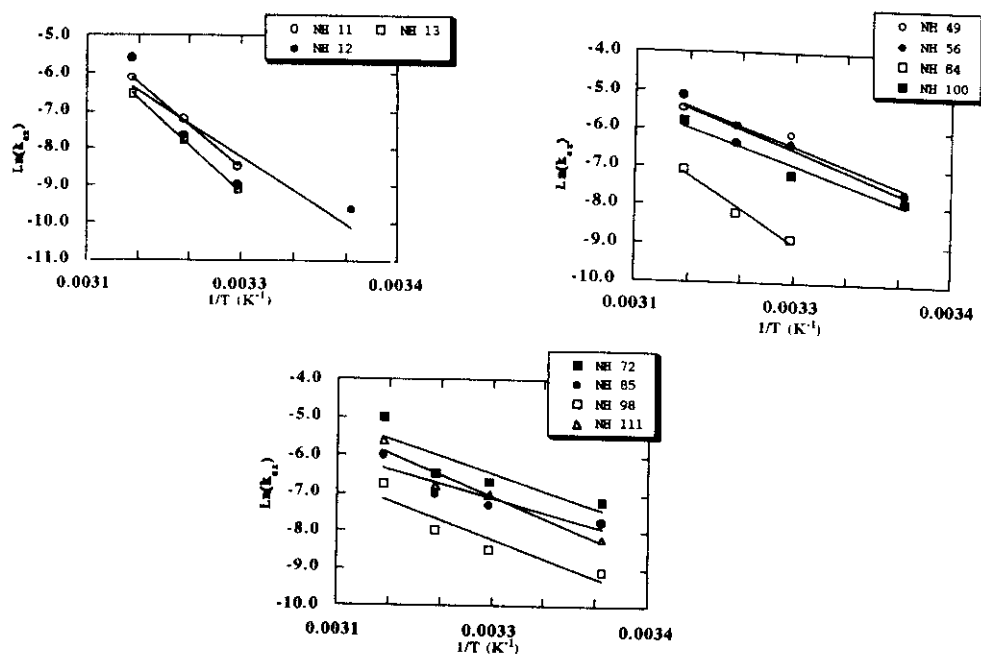


Fig. III.11. : Gráficas de Arrhenius para la Ribonucleasa A a pH = 6.0 (tampón de fosfato) y 0.2 M de NaCl .

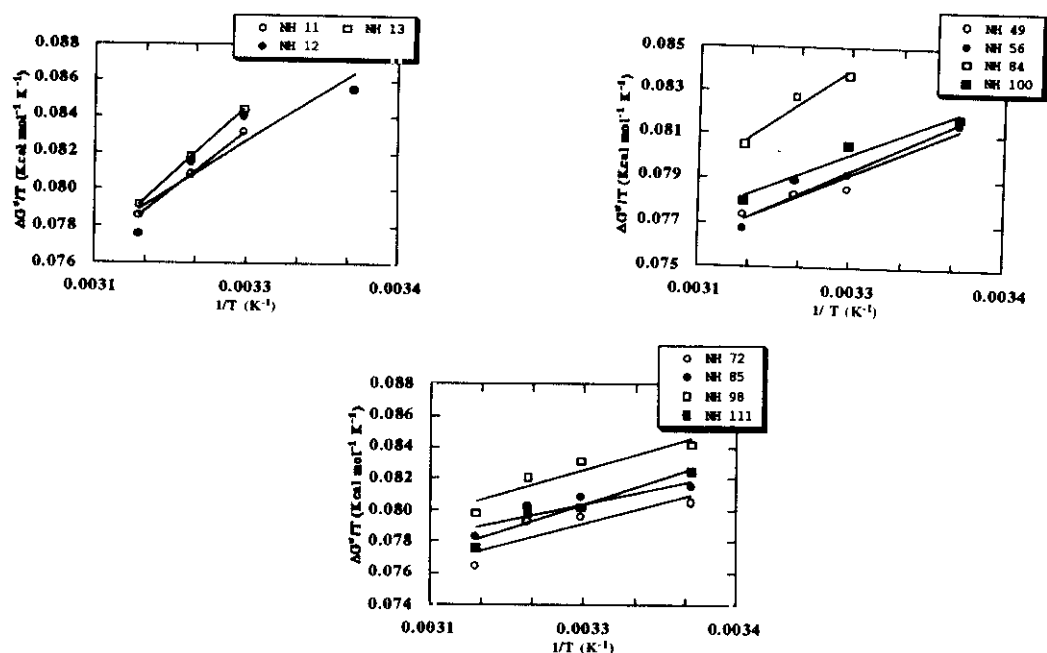


Fig. III.12. : Gráficas de $\Delta G^\ddagger/T$ versus $1/T$ de la Ribonucleasa A a pH =6.0 (tampón de fosfato) y 0.2 M de NaCl, para los protones con medidas cinéticas a varias temperaturas. La pendiente (ΔH^\ddagger) y la ordenada en el origen (ΔS^\ddagger), aparecen en la Tabla III.7.

Tabla III.7

Parámetros cinéticos calculados para Ribonucleasa A. Entre paréntesis se da la desviación estándar. En los restantes las estimaciones de la incertidumbre son del 30 %.

Condiciones: pH = 6.0 (tampón de fosfato) y 0.2 M de NaCl. .

Residuo	ΔH^\ddagger (Kcal mol ⁻¹)(1)	ΔH^\ddagger (Kcal mol ⁻¹)(2)	ΔS^\ddagger (Cal mol ⁻¹ K ⁻¹) (3)	ΔS^\ddagger (Cal mol ⁻¹ K ⁻¹) (2)	ΔH_{dl} (Kcal mol ⁻¹)(4)
Gln 11	46.4	44.0	67.4 (± 1.6)	60.0	29.4
His 12	35.4	35.3	32.1 (± 0.1)	32.2	18.4
Met 13	50.6	50.9	79.8 (± 0.1)	80.9	33.6
Glu 49	20.6	19.3	-12.2 (± 0.4)	-16.3	3.6
Ala 56(5)	21.6	21.0	-9.2 (± 0.5)	-11.2	4.6
Cys 72	18.1	16.8	-20.3 (± 0.8)	-24.4	1.1
Cys 84	34.5	31.2	27.8 (± 0.4)	17.6	17.5
Arg 85	15.0	13.7	-31.9 (± 0.5)	-35.8	-2.0
Lys 98	20.1	19.3	-17.2 (± 0.7)	-19.8	3.1
Thr 100	19.4	18.0	-17.0 (± 0.4)	-21.5	2.4
Glu 111	22.5	22.0	-7.2 (± 0.5)	-10.5	5.5

(1) Calculados a partir de la representación de Arrhenius.

(2) Calculados a partir de la representación de $\Delta G^\ddagger/T$ versus $1/T$.

(3) Calculados a partir de la expresión termodinámica de ΔG^\ddagger , y tomando una media aritmética de los tres valores obtenidos.

(4) Obtenido a partir de {12} haciendo uso del ΔH^\ddagger obtenido en las representaciones de Arrhenius.

(5) El valor de los parámetros cinéticos es muy incierto debido a que se produce el solapamiento de su señal con la de Gln 28.

el valor anómalo en ambos parámetros cinéticos puede ser el reflejo de ese comportamiento.

Podemos igualmente comparar aquí, lo que ocurre con los parámetros cinéticos de residuos que presentan la misma o similar K_{op} , es decir forman una *unidad cooperativa de desnaturalización*. Gln 11, His 12 y Met 13, parecen intercambiarse por un proceso cooperativo al mismo tiempo, y sus energías de activación, esto es, lo que le "cuesta" a cada uno de ellos alcanzar la energía necesaria para romper los enlaces de hidrógeno y

activarse es muy parecida (todos los valores reflejados entran dentro del error experimental del 30 %). Un caso parecido sucede con la otra unidad que aparece en las hebras β_4 y β_5 : Arg 85/Thr 100, para la que la energía de activación es similar, dicho de otra forma, ambas intercambian de una forma cooperativa, con la misma energía y prácticamente con la misma velocidad.

Sin embargo, un caso contrario se da en una *unidad de desplegamiento* que existe en las hebras β_4 y β_5 : Cys 84/Lys 98, donde a pesar de sus similares valores energéticos termodinámicos, no ocurre igual con sus parámetros cinéticos, ya que a los protones de la Cys 84 les "cuesta" mucho más intercambiar (con una energía de 34 Kcal mol⁻¹)

A este pH existen, sin embargo varios aminoácidos con una $\Delta S^\ddagger < 0$. Como se observa estos residuos pertenecen a las láminas β , con ambos átomos importantes para el intercambio (el O y el N peptídicos) implicados en sendos enlaces de hidrógeno, en zonas perteneciente a las partes más internas de la proteína (hebras β_2 , β_4 y β_5), en ellos, al igual que ocurría a pH = 2.5 el disolvente se ha de "ordenar" adecuadamente para conseguir el intercambio.

3.3.3 INTERCAMBIO DE RIBONUCLEASA S A PH = 6.0.

Constantes cinéticas de intercambio, factores de protección y energías libres de fluctuación global y local.

En la Fig III. 13 se representan los resultados de las medidas de constantes cinéticas de intercambio H/D a la temperatura de 288 K, 298 K, 308 K y 313 K. En la mencionada Figura se incluyen, como en los resultados ya comentados los factores de protección y las energías libres de fluctuación global y local. Comparado con el intercambio de Ribonucleasa A a este pH se puede observar un decrecimiento general de la estabilidad de la proteína modificada. Este hecho es un reflejo de la diferente estabilidad termodinámica de ambas especies, como puede deducirse de medidas calorimétricas de desnaturalización (Kim et al., 1992), confirmadas por nosotros (véase 3.4.). Las energías están en el rango de 4 a 7 Kcal mol⁻¹ para todas las temperaturas de tal forma que los protones más lentos intercambian con energías del orden de 6 a 7 Kcal mol⁻¹.

Relación de las propiedades de intercambio con rasgos estructurales.

Como era de esperar (Labhardt, 1982), la hélice I (residuos 3 al 13) es la que presenta en conjunto una mayor diferencia en cuanto a sus propiedades de intercambio, pues en la Ribonucleasa S, el fragmento 1-20 está unido al resto de la proteína (residuos

21-124) por enlaces no covalentes. Consecuentemente por ello, todos los protones peptídicos del S-péptido intercambian con una cinética mucho más rápida que la que permite nuestra ventana de medida. Únicamente el protón peptídico de Met 13, residuo

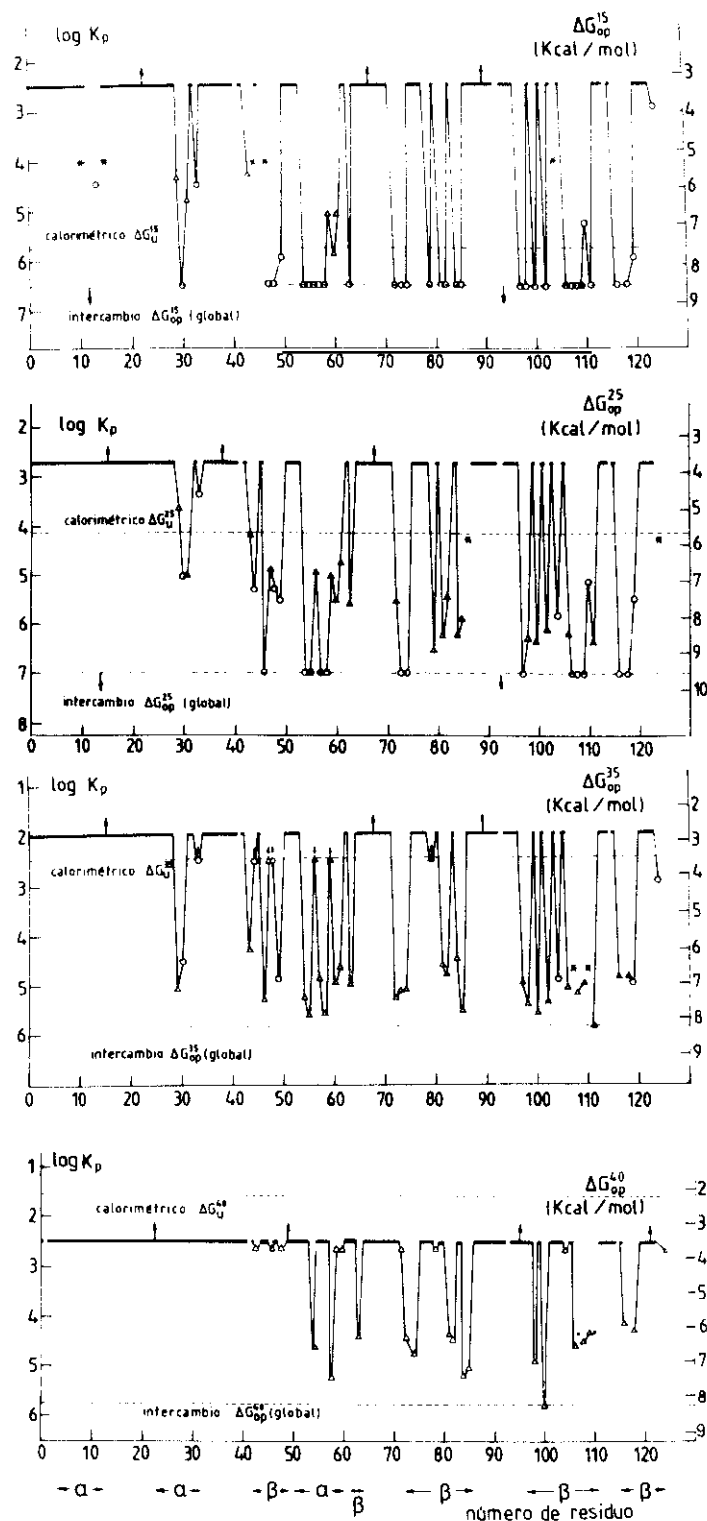


Fig. III.13. : Comportamiento dinámico de la Ribonucleasa S a pH = 6.0 (tampón fosfato) y 0.2 M de NaCl .

que se encuentra en la interfase de la hélice con la proteína y cuya cadena lateral presenta múltiples contactos con el interior de la proteína (Wand et al., 1985), presenta un factor de protección de 4.5 a la temperatura más baja (288 K). Este residuo parece ser pues el "anclaje" de la hélice a la proteína para evitar la disociación del complejo en el S-péptido y S-proteína.

Estos resultados, difieren en parte de los presentados por Kuwajima y Baldwin (Kuwajima & Baldwin, 1983 a y b), en donde tras explorar varias condiciones de trabajo, en las condiciones más cercanas a las nuestras (pH = 6.0, 289 K) obtienen también como protón de intercambio más lento la Met 13 (aunque en otras condiciones aparece la His 12 como la que intercambia más lentamente). Sin embargo, a diferencia de nuestras medidas, ellos obtienen valores ralentizados para las cinéticas de intercambio de Phe 8, Glu 9, Arg 10 y Gln 11. Ello puede ser debido a que su proceso de medida incluye una liofilización, en donde pueden producirse fenómenos de agregación que desvirtúan la fiabilidad de los resultados. También difieren nuestros resultados de los obtenidos por intercambio de tritio y posterior escisión triptica (Rosa & Richards, 1979) en los que no encuentran al protón de Met 13 como especialmente protegido.

La segunda hélice se halla, como en la Ribonucleasa A, en situación intermedia frente al intercambio. Desde 288 K hasta 308 K, los protones peptídicos de los residuos Met 29, Met 30 y Lys 31, se encuentran protegidos si bien en menor medida que los de la hélice III y los pertenecientes a las lámina β .

La hélice III presenta dos protones, los correspondientes a Val 54 y Ser 59, protegidos frente al intercambio; incluso uno de ellos aparece con un factor de protección del orden de 3, a la temperatura de 313 K, cercana ya a la temperatura de desnaturalización. De la consideración de las variaciones entre las cinéticas de intercambio del segmento Val 54-Ser 59 en Ribonucleasa A y Ribonucleasa S, puede deducirse la posible existencia de diferencias en el empaquetamiento del S-péptido con la zona donde se encuentra la hélice III, como parece deducirse también de la menor intensidad de los efectos NOE entre los protones de los residuos Glu 9, Gln 11 y Met 13 con los de la hélice III. El empaquetamiento en la Ribonucleasa S sería más móvil, permitiendo así el acceso al disolvente.

Como ocurría en la Ribonucleasa A, los protones implicados en las láminas son los que presentan los factores de protección más altos, persistiendo sin intercambio apreciable hasta elevadas temperaturas; de hecho, de los 16 protones que a 313 K, conservan poblaciones protónicas detectables, 14 de ellos pertenecen a las láminas. De acuerdo con las cinéticas medidas, podemos decir que las unidades locales de desnatura-

lización de Ribonucleasa S (ver Tabla III.9) son equivalentes a las de la proteína nativa (Tabla III.7) y que la estructura y la dinámica de las láminas β son muy parecidas. La diferencia entre ambas proteínas radica, obviamente, en los valores de ΔG_{op} , las energías libres de los equilibrios de apertura, que son consistentemente mayores en la Ribonucleasa A, como corresponde a su mayor estabilidad.

En el segmento Ile 81-Arg 85, se observan pequeñas diferencias en relación a la Ribonucleasa A en cuanto a las variaciones de las constantes cinéticas entre residuos y en la de éstas frente a la temperatura. Estas variaciones han de atribuirse a la ausencia en la Ribonucleasa S del fragmento estructurado del S-péptido Ser 15-Ser 23 que en la Ribonucleasa A "cruza" transversalmente la primera lámina protegiéndola del disolvente.

Tabla III.9

Comportamiento de intercambio de Ribonucleasa S (pH = 6.0 (tampón de fosfato) y 0.2 M de NaCl). Se usa la nomenclatura IUPAC-IUB para nombrar los aminoácidos.

Unidades de desnaturalización	Condiciones de observación	Implicación en la estructura nativa	ΔG_{op} (Kcal mol ⁻¹)
V63, C72, Y73, Q74, I106, V108, A109, V116, V118 e H119	308 K y 313 K	Hebras β_2 , β_3 , β_6 y β_7	7.2
I81, T82 y C84	308 K	Hebra β_4	6.5
R85, K98, T100 y A102	308 K	Hebras β_4 y β_5	7.5
C84, R85 y K98	313 K	Hebras β_4 y β_5	7.3
Y73, Q74, I81, T82 y C84	313 K	Hebras β_3 y β_4	6.5
V57, Q60* y K61	308 K	Hélice α III	7.0
A56 y S59 (Q60*)	308 K (313 K)	Hélice α III	Muy rápidos para ser medidos con precisión.
V54, Q55 y C58	308 K	Hélice α III	7.8

* Indica un aminoácido, que dependiendo de la temperatura que se da entre paréntesis, se incorpora o no a la unidad de desplegamiento.

Otra diferencia digna de destacar es la menor protección observada en la Ribonucleasa S, para la pareja de protones Met 79-Lys 104 que ha de relacionarse con la misma causa anterior, así como con diferencias en el empaquetamiento de la hélice III con

la segunda lámina, como se manifiesta por la menor intensidad observada en los efectos NOE entre protones de los residuos Val 54 y Val 57 con Met 79.

Los protones peptídicos involucrados en la segunda lámina (entre 288 K y 308 K) presentan unas propiedades de intercambio análogas a las observadas en la Ribonucleasa A, si bien en una escala global de energías libres de fluctuación consistentemente menor. A 313 K cerca ya de la temperatura de desnaturalización térmica, los protones de Val 63, Ile 106, Val 108, Ala 109, Val 116 y Val 118, están aún suficientemente protegidos como para que su cinética de intercambio pueda ser medida. La abundancia de residuos de tipo valina en estos núcleos resistentes al intercambio, puede interpretarse como que los protones peptídicos de este tipo de residuos están especialmente protegidos frente al intercambio en el estado abierto, debido al gran volumen de su cadena lateral (Robertson & Baldwin, 1991).

Evidentemente, todos aquellos protones que muestran ya un intercambio rápido en las condiciones de pH = 2.5 en Ribonucleasa A, como los pertenecientes a los giros no aparecen en la Ribonucleasa S.

En la Tabla III.9 se resume el comportamiento frente al intercambio de la Ribonucleasa S. Se incluyen las unidades de desnaturalización y sus correspondientes energías libres de equilibrio entre las formas nativa y abierta.

Parámetros cinéticos

Los parámetros obtenidos de forma dual a los anteriores se encuentra tabulados en Tabla III.10. En las Figs.III.14 y III. 15 aparecen las representaciones gráficas.

Como se observa en la Tabla III.10 el único $\Delta H_{op} < 0$ es el de la Val 43, nuevamente achacable a que el parámetro de ΔH^\ddagger para péptidos modelos no puede ser aplicado aquí. Este residuo posee igualmente una ΔS^\ddagger , que resulta ser negativa, al igual que Met 29. La única explicación para la Val 43 es nuevamente el enorme "ordenamiento" de las moléculas del disolvente para producir el intercambio. En la Met 29 el valor negativo puede deberse al error experimental.

El valor más alto de ΔS^\ddagger (así como de ΔH^\ddagger) corresponde a Val 63, Ile 81 y Cys 84, todas ellas implicadas en la segunda lámina, y que como era previsible corresponde a residuos que han de "desordenar" mucho su entorno para poder intercambiarse, hecho lógico si consideramos que están enterrados en el centro de la lámina, el "corazón" de la proteína, y que para conseguir "exponerse" al disolvente la proteína ha de estar práctica-mente desplegada.

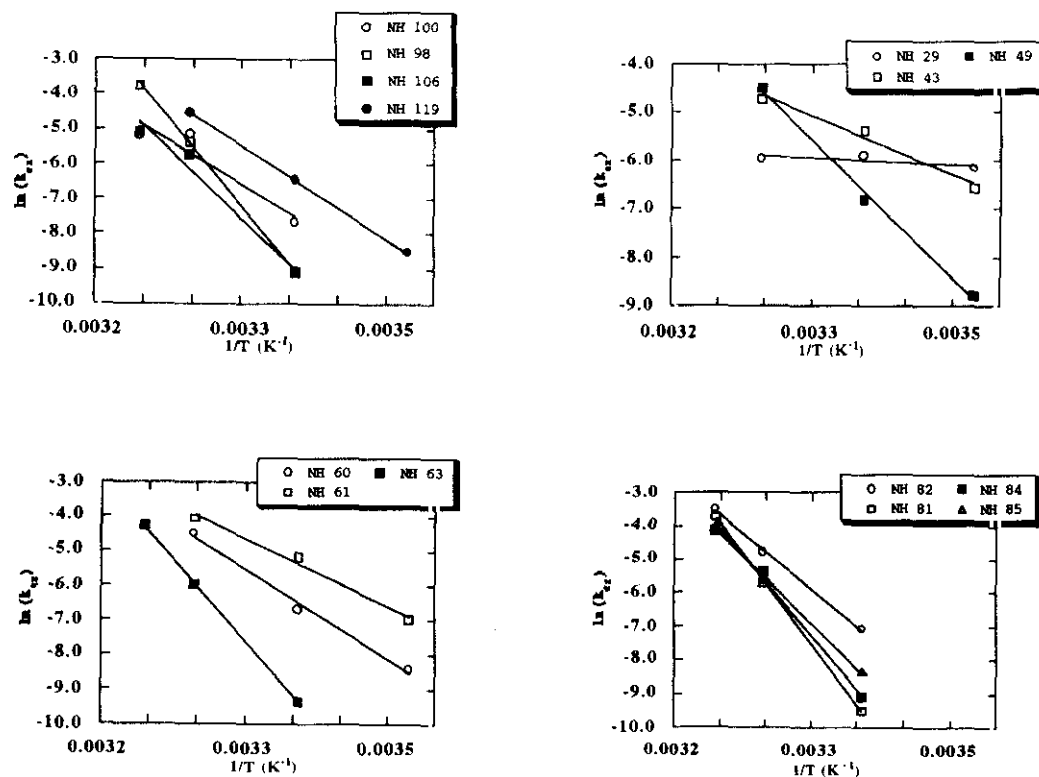


Fig. III.14. : Gráficas de Arrhenius para la Ribonucleasa S a pH = 6.0 (tampón de fosfato) y 0.2 M de NaCl .

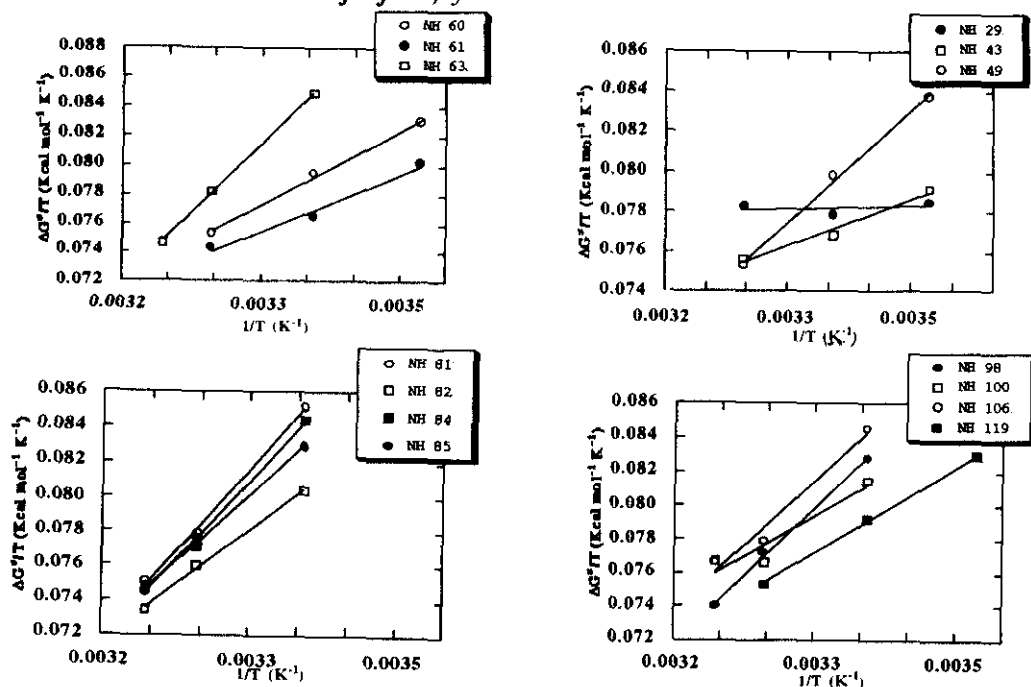


Fig. III.15. : Gráficas de $\Delta G^\ddagger/T$ versus $1/T$ de la Ribonucleasa S a pH = 6.0 (tampón de fosfato) y 0.2 M de NaCl, para los protones con medidas cinéticas a varias temperaturas. La pendiente (ΔH^\ddagger) y la ordenada en el origen (ΔS^\ddagger), aparecen en Tabla III.11.

Tabla III.10

Parámetros cinéticos calculados para Ribonucleasa S. Entre paréntesis se da la desviación estándar. En los restantes las estimaciones de la incertidumbre son del 30 %.

Condiciones: pH = 6.0 (tampón de fosfato) y 0.2 M de NaCl. .

Residuo	ΔH^\ddagger (Kcal mol ⁻¹)(1)	ΔH^\ddagger (Kcal mol ⁻¹)(2)	ΔS^\ddagger (Cal mol ⁻¹ K ⁻¹) (3)	ΔS^\ddagger (Cal mol ⁻¹ K ⁻¹) (2)	ΔH_{op} (Kcal mol ⁻¹)(4)
Met 29(5)	1.7		-72.4 (± 0.3)		-15.3
Val 43	16.1	15.6	-23.1 (± 0.2)	-24.6	-0.9
Glu 49	37.5	37.0	46.2 (± 0.3)	44.6	20.5
Gln 60	34.3	34.0	35.8 (± 0.3)	34.9	17.3
Lys 61	25.7	26.2	8.9 (± 0.8)	11.1	8.7
Val 63	62.0	63.0	123.1 (± 0.2)	126.7	45.0
Ile 81	70.5	63.9	150.9 (± 0.3)	129.6	53.5
Thr 82	43.6	42.9	65.6 (± 0.4)	63.5	26.6
Cys 84	61.8	61.3	122.8 (± 0.5)	121.5	44.8
Arg 85	57.7	51.1	110.4 (± 0.6)	88.7	40.7
Lys 98	65.8	54.2	136.7 (± 0.9)	99.2	48.8
Thr 100	33.0	32.3	29.4 (± 0.9)	27.2	16.0
Ile 106	51.8	51.3	89.6 (± 0.5)	87.9	34.8
His 119	34.8	34.0	37.6 (± 0.2)	35.1	26.2

(1) Calculados a partir de la representación de Arrhenius.

(2) Calculados a partir de la representación de $\Delta G^\ddagger/T$ versus $1/T$.

(3) Calculados a partir de la expresión termodinámica de ΔG^\ddagger , y tomando una media aritmética de los tres valores obtenidos.

(4) Obtenido a partir de {12} haciendo uso del ΔH^\ddagger obtenido en las representaciones de Arrhenius.

(5) No se ha representado $\Delta G^\ddagger/T$ versus $1/T$, porque el ajuste a la recta es muy malo, al igual que ocurre con su correspondiente representación de Arrhenius.

De igual forma que en los siguientes apartados compararemos los valores termodinámicos podemos comparar los valores cinéticos de ambas. Una comparación entre las diferentes ΔG^\ddagger se da en la Tabla A.3 del Apéndice, para un residuo que aparezca a dos

temperaturas en las dos especies. En líneas generales se puede ver que (ver nota 4 para la Tabla III.12) para cualquier temperatura y protón:

$$\Delta G^\ddagger_A \geq \Delta G^\ddagger_S$$

o lo que es lo mismo, y que ya ha sido varias veces comentado:

$$k_{ex}^A \leq k_{ex}^S$$

lo cual parece lógico ya que si la Ribonucleasa A es más estable, el proceso en el camino de reacción será más grande y le "costará" más intercambiar para llegar al mismo estado desnaturalizado final. Si se comparan las ΔG^\ddagger e ΔH^\ddagger de residuos que aparezcan en ambas especies y para los que sea posible obtener el valor de las constantes de intercambio a diferentes temperaturas, se encuentra que sorprendentemente (Tabla III.12):

$$\Delta H^\ddagger_S \geq \Delta H^\ddagger_A$$

de donde se deduce que para compensar el efecto en la energía libre de activación, las entropías de ambos han de guardar la relación:

$$\Delta S^\ddagger_S \geq \Delta S^\ddagger_A$$

que se puede comprobar experimentalmente para los residuos Glu 49, Cys 84, Arg 85, Lys 98 y Thr 100, para los que se observa que incluso en la Ribonucleasa A, los valores de las entropías de activación son negativos. Obsérvese que todos estos residuos son los que pertenecen a la primera lámina, que es la que "cruzaba" el S-péptido en la proteína nativa y al extremo de la hélice II, contra la que se empaquetaba la hélice I. Este resultado confirma nuestra suposición anterior acerca del origen negativo del término entrópico, pues si en aquellos el hecho de que el valor de la entropía fuera negativo se atribuía a la ordenación del disolvente alrededor de los residuos, en la Ribonucleasa S, el disolvente no se ha de "ordenar" tanto en el entorno de los aminoácidos de la primera lámina ni de los extremos de la hélice II, pues estos se encuentran más expuestos, al carecer de la protección del S-péptido. En la Fig III.16 se da un esquema de como debe ser el estado de transición para ambas especies.

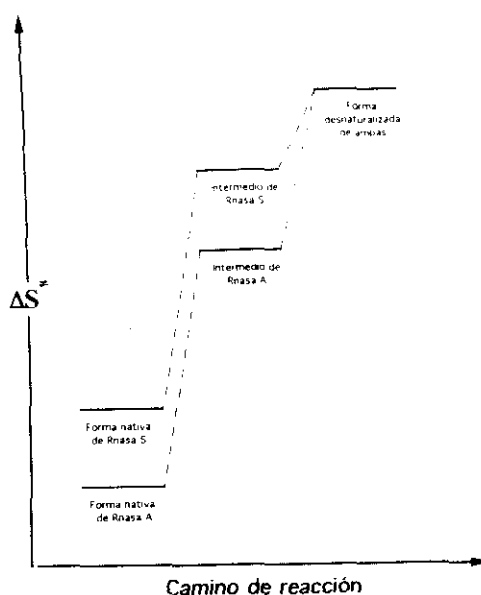


Fig. III.16. : Esquema de la entropía del estado de transición para el intercambio en Ribonucleasa S y Ribonucleasa A.

3.3.4. MEDIDAS CALORIMÉTRICAS.

A partir de las curvas de desnaturalización térmica obtenidas según lo descrito en el apartado 3.2.6., se obtuvieron los parámetros termodinámicos que caracterizan dicho proceso: el calor de desnaturalización, ΔH_m , la temperatura media de desnaturalización térmica, T_m y la diferencia entre los calores específicos entre la forma nativa y desnaturalizada, ΔC_p , para la Ribonucleasa A a pH = 2.5 y pH = 6.0, y para Ribonucleasa S a pH = 6.0. Los resultados se dan en la Tabla III.12.

El cociente entre la entalpía procedente de las medidas calorimétricas, ΔH_m , y la llamada entalpía de Van't Hoff, ΔH_{VH} , obtenida de la representación de $\ln(K_u)$ (donde K_u es la constante que rige el equilibrio entre las forma nativa y desnaturalizada de la proteína) frente a $1/T$, suele adoptarse como criterio de que el sistema obedece al modelo termodinámico de dos estados (Privalov, 1979). Para Ribonucleasa A a pH = 2.5 este cociente, según nuestras medidas experimentales es prácticamente igual a 1.0. En cambio a pH = 6.0 el valor de dicho cociente discrepa ligeramente de la unidad de acuerdo con lo observado en trabajos anteriores (Tsong et al., 1972; Batistel et al., 1991) en donde este hecho se atribuye a errores experimentales (Batistel et al., 1991). En este trabajo, preferimos aceptar que la transición no responde a un modelo tan sencillo como el de los dos estados. Por el contrario, la Ribonucleasa S a pH = 6.0 sí responde al mencionado modelo.

Tabla III.12

Medidas calorimétricas en Ribonucleasa A y Ribonucleasa S a pH = 2.5 (tampón de glicina) y pH = 6.0 (tampón de fosfato). Los parámetros termodinámicos son: el calor de desnaturalización, ΔH_m , la temperatura media de desnaturalización térmica, T_m y la diferencia entre los calores específicos entre la forma nativa y desnaturalizada, ΔC_p .

Entre paréntesis se indican las desviaciones estándar de cada uno de ellos.

Proteína	pH	T_m (K)	ΔH_m	ΔC_p
Ribonucleasa A	6.0	336.7 (± 0.2)	113.5 (± 10)	1300 (± 100)
Ribonucleasa A	2.5	313.1 (± 0.1)	85 (± 2)	1145 (± 50)
Ribonucleasa S	6.0	321.5 (± 0.3)	89.3 (± 0.5)	1031 (± 200)

3.3.5. ENERGÍAS LIBRES DE DESNATURALIZACIÓN CALORIMÉTRICAS Y LAS DEDUCIDAS A PARTIR DE DATOS DEL INTERCAMBIO H/D. PROPIEDADES DEL ESTADO DESNATURALIZADO.

En la Tabla III.13 se dan los valores de los parámetros termodinámicos, ΔG_u e ΔH_u , correspondientes al proceso de desnaturalización térmica para las temperaturas en que se han medido las constantes cinéticas de intercambio en Ribonucleasa A (para los pH = 2.5 y pH = 6.0) y Ribonucleasa S (pH = 6.0). Estos valores se han calculado utilizando las expresiones {17} y {18} dadas en el apartado 3.2.6. En dicha Tabla se dan también los valores de las energías libres de fluctuación conformacional entre el estado nativo y el abierto obtenidas como promedio a partir de datos del intercambio, para los protones pep-tídicos más protegidos, en el caso de que existan valores medibles de los mismos con la ventana espectral usada. En este caso se trata de una fluctuación global cooperativa, es decir, la forma abierta es el estado desnaturalizado, por lo que ΔG_{op} habría de coincidir con ΔG_u .

Del examen de los tres grupos de valores dados en la Tabla mencionada, podemos decir que existe un paralelismo cualitativo entre los datos calorimétricos y los de intercambio, reflejando ambos la ordenación relativa de las estabildades en los tres casos estudiados; a su vez un examen de las Tablas III.7 y III.9 se demuestra que el intercambio se produce en ambas proteínas a través de las mismas o muy parecidas

unidades cooperativas de desnaturalización, indicando que si bien la dinámica de fluctuaciones es más lenta en la proteína más estable (Ribonucleasa A) el mecanismo por el que se produce el intercambio es muy similar en ambas proteínas (Wagner & Wüthrich, 1979; Wagner et al., 1984). Las estabildades termodinámicas estimadas a partir de datos del intercambio pueden compararse para las dos proteínas a la temperatura de 313 K para la que existen medidas en ambas de las constantes cinéticas para los protones más lentos (los resultados están tabulados en la Tabla A.7 del apéndice). La diferencia en energías

Tabla III.13

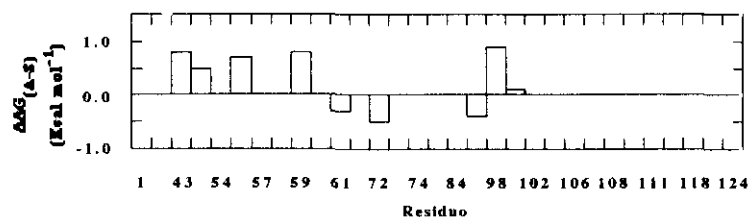
Energías libres, ΔG_u , y entalpías libres de desnaturalización térmica, ΔH_u , de Ribonucleasa A y Ribonucleasa S, calculadas a partir de datos calorimétricos. Energías libres de fluctuación, ΔG_{op} , calculadas a partir de datos de intercambio de los protones más lentos (para las dos medidas pH = 2.5 (tampón glicina) y pH = 6.0 (tampón fosfato) ambos en 0.2 M de NaCl). Entre paréntesis se incluye la desviación estándar.

Temperatura (K)	ΔH_u (Kcal mol ⁻¹)	ΔG_u (Kcal mol ⁻¹)	ΔG_{op} (Kcal mol ⁻¹)
Ribonucleasa A, pH = 6.0			
308	79.2 (±0.2)	1.5 (±0.1)	5.6 (±0.8)
298	67.7 (±0.1)	3.7 (±0.2)	
288	56.2 (±0.1)	6.8 (±0.2)	
Ribonucleasa A, pH = 6.0			
318	89.2 (±0.2)	5.6 (±0.1)	9.0 (±0.8)
313	82.7 (±0.1)	6.8 (±0.2)	9.1 (±0.9)
308	76.2 (±0.1)	8.0 (±0.2)	
298	63.2 (±0.1)	10.0 (±0.2)	
Ribonucleasa S pH = 6.0			
313	80.5 (±0.2)	2.2 (±0.1)	6.6 (±0.6)
308	75.4 (±0.2)	3.5 (±0.3)	7.1 (±0.8)
298	65.0 (±0.1)	5.6 (±0.2)	
288	54.7 (±0.1)	7.5 (±0.2)	

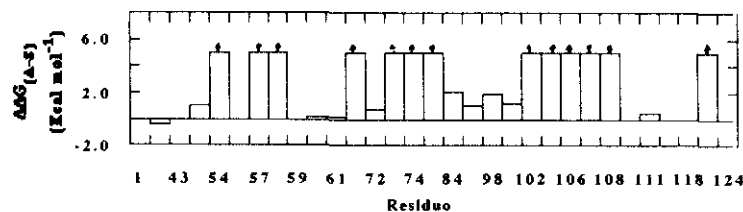
libres de fluctuación, $\Delta\Delta G_{Op}$, en el mejor de los casos es de $3.8 \text{ Kcal mol}^{-1}$. Este valor muestra un acuerdo satisfactorio con la diferencia de energías libres, $\Delta\Delta G_u$, a esa temperatura medida calorimétricamente, que es $\Delta\Delta G_u = 4.6 \text{ Kcal mol}^{-1}$. En la Fig III. 17 se representan estas diferencias no sólo para esta temperatura sino también para las otras temperaturas en las que hay medidas para el mismo protón en las dos especies de proteína.

El resultado de mayor importancia que puede deducirse de la comparación de los valores de ΔG_u e ΔG_{Op} , dados en la Tabla III.13 es la gran discrepancia entre ambos valores. El valor de ΔG_{Op} deducido es consistentemente mayor a cualquier pH, y a las temperaturas más altas (fluctuaciones globales), en $4.0\text{-}4.4 \text{ Kcal mol}^{-1}$ que el obtenido calorimétricamente. Este resultado reviste especial importancia pues de momento invalida la propuesta de poder medir (Roder, 1989) mediante el método de intercambio, las energías libres de desnaturalización en condiciones nativas, lejos de la temperatura del cambio de fase y evitando, en general, situaciones de irreversibilidad.

298 K



308 K



313 K

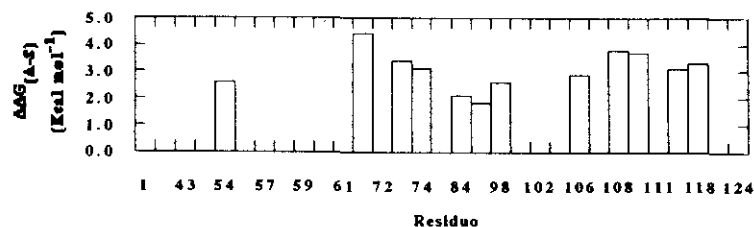


Fig. III.17. : Diagrama de barras indicando las diferencias en las energías libres de Ribonucleasas A y S a 298 K, 308 K y 313 K (las flechas a 308 K indican aquellos residuos que son medibles en la Ribonucleasa S, pero para los que no hay constante con la ventana espectral usada en la Ribonucleasa A). Condiciones: 4 mM de ambas proteínas, pH = 6.0 y 0.2 M de NaCl.

En la Tabla III.14, aparecen tabulados los valores de energías libres de desnaturalización procedentes de medidas caloriméticas y de medidas de intercambio H/D para las proteínas: la lisozima del huevo (HWL), el inhibidor de tripsina (BPTI) y las Ribonucleasas A y S. Sólo la lisozima muestra un comportamiento acorde con el modelo de intercambio: la energía libre deducida de datos de intercambio es ligeramente inferior a la medida calorimétricamente ($\Delta G_u > \Delta G_{op}$), indicando que incluso para los protones más lentos, la fluctuación que propicia el intercambio no requiere tanta energía como la desnaturalización global. El BPTI presenta pequeñas diferencias en sentido contrario, que pudieran adscribirse a errores experimentales. En el caso de las Ribonucleasas A y S, las diferencias son por el contrario, suficientemente grandes como para no poder adscribirse a éstos.

Es importante analizar en detalle las posibles causas de la discrepancia encontrada:

1.- ***Las velocidades de intercambio medidas están infravaloradas porque dichas medidas se obtuvieron de muestras obtenidas disolviendo directamente en D₂O la proteína liofilizada.*** En medidas análogas descritas en la bibliografía (Wand et al., 1985), la proteína se deja equilibrar en la disolución durante un período de al menos 12 horas antes de proceder a las medidas de intercambio. Como nosotros no habíamos seguido este procedimiento, se realizó un experimento en el que se equilibró una muestra de la proteína en una disolución concentrada en solución H₂O durante 36 horas a temperatura ambiente. Una alícuota de la misma (10 μ l) se disolvió en el tampón de D₂O hasta completar un volumen de 0.5 ml. Para obrar con mayor rapidez, el pH de la muestra no fue ajustado y la temperatura fue de 308 K, que es donde se obtuvieron más datos experimentales. Las constantes de intercambio aparecen representadas en la forma usual en la Fig. III.18. Una posterior medida del pH determinó que este era 5.4, pero aún así las constantes están dentro del error experimental esperado.

2.- ***La extrapolación de los datos calorimétricos a condiciones nativas introduce grandes errores en ΔG_u .*** La incertidumbre en los valores de ΔG_u a temperaturas lejanas a la temperatura de desnaturalización (T_m), puede obtenerse a partir de las incertidumbres en los valores de los parámetros calorimétricos medidos. Las magnitudes de los errores en ΔG_u se representan en cada una de las Figuras en donde se dan las constantes cinéticas y son mucho menores que las discrepancias observadas. La posible dependencia de ΔC_p , respecto a la temperatura no introduciría errores notables en la evaluación de ΔG_u , según puede deducirse de la repetida corroboración en múltiples proteínas de las expresiones en las

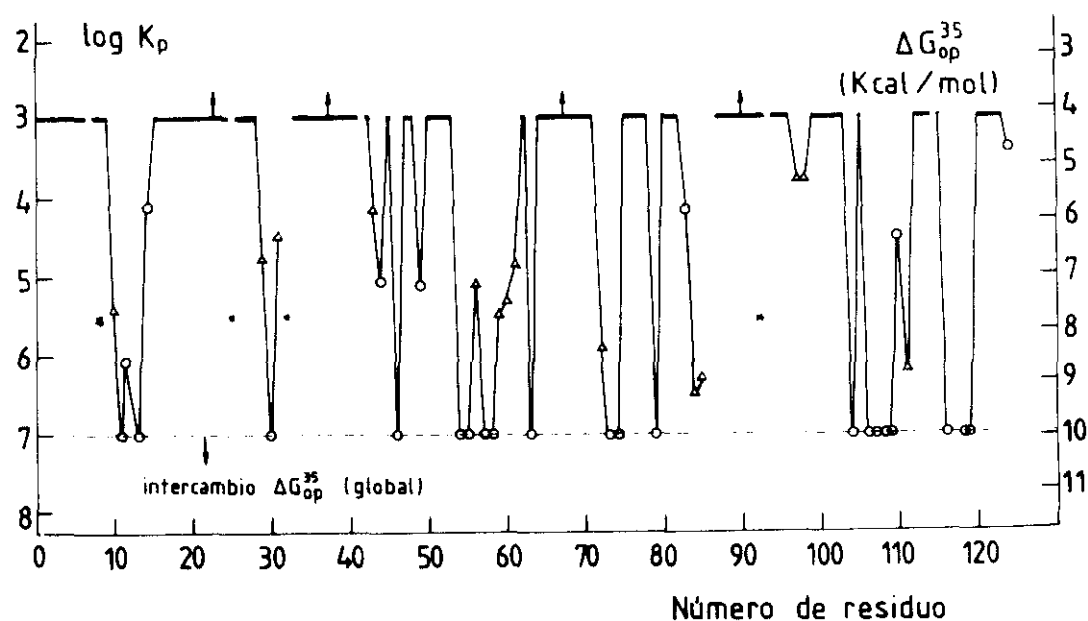


Fig. III.18. : Comportamiento dinámico de Riboncleasa A. Condiciónes: pH = 5.4 (tampón de fosfato) y 0.2 M de NaCl .

Tabla III.13

Comparación de las ΔG_u e ΔG_{op} para varias proteínas en diferentes condiciones de pH. T_m es la temperatura de desnaturalización térmica.

Proteína	pH	T_m (K)	ΔG_{op} (Kcal mol ⁻¹)	ΔG_u (Kcal mol ⁻¹)
BPTI	6.5	328	10.0 (1)	8.6 (2)
BPTI	7.0	341	8.8 (1)	6.5 (2)
HWL	4.0	310	9.9 (3)	11.5 (2)
HWL	5.0	310	10.3 (3)	10.5 (2)
Ribonucleasa A	2.5	308	5.6(4)	1.5(4)
Ribonucleasa A	6.0	318	10.1(4)	5.6(4)
Ribonucleasa S	6.0	313	6.2(4)	2.2(4)

(1) Obtenidos de (Roder, 1989).

(2) Obtenidos de Thermodynamic Data for Biophysical Science, 1991.

(3) Obtenidos de (Delapierre et al., 1987) y (Radford et al., 1992).

(4) Obtenidos de los resultados experimentales expuestos en este trabajo, únicamente para los protones con un intercambio más lento.

que se supone que ΔC_p es independiente de la temperatura (Privalov, 1979; Privalov & Gill, 1988).

3.- El haber despreciado el término catalítico correspondiente al agua sin ionizar puede introducir grandes errores en las k_c evaluadas.

Existe un acuerdo general en que el término catalítico correspondiente al k_w no es importante debido a que sus efectos son demasiado pequeños. Dicho efecto sólo es notorio cerca del $pH_{mín}$ (Jeng & Englander, 1991); su correspondiente entalpía de activación para poli (DL-alanina), ΔH^\ddagger , es mayor que la de la catálisis ácida (del orden de 20 Kcal mol⁻¹) (Gregory et al., 1983), por lo que sus efectos se harán notar sólo a altas temperaturas, donde la región del $pH_{mín}$ se vuelve muy ancha, presentando un mínimo poco profundo.

3.- El origen de la discrepancia está en los valores utilizados para k_c , las constantes cinéticas de intercambio en el estado desnaturalizado. Esta ha de ser sin duda la causa más verosímil. Una demostración indirecta se encuentra cuando estas constantes cinéticas no entran en juego (caso de la diferencia $\Delta\Delta G_{op}$ entre Ribonucleasa A y S) la concordancia con el incremento relativo en energía libre medido calorimétricamente es satisfactorio. Recordemos que tanto los valores evaluados por las reglas aditivas de Molday (Molday et al., 1972) como las medidas experimentales (Robertson & Baldwin, 1991) han de transferirse a las condiciones de pH y temperatura en las que se realizan las medidas cinéticas de k_{ex} . Para la transferencia a distintas temperaturas han de utilizarse las entalpías de activación del intercambio catalizado por ácidos, H^+ , y bases, OH^- , en compuestos modelo, para los que existe un rango de valores de 13-15 Kcal mol⁻¹ para el primero y 1.2-2.6 Kcal mol⁻¹ para el segundo. Las incertidumbres en los valores de ambas entalpías de activación no son lo suficientemente grandes como para responder de la diferencia encontrada en las energías libres de desnaturalización por los métodos calorimétrico y de intercambio. Para alcanzar un acuerdo entre estas energías libres haría falta aceptar un valor para ΔH^\ddagger (catálisis básica) completamente fuera de lugar. En consecuencia, nuestra conclusión es que el estado desnaturalizado de una proteína no puede asimilarse al de un homooligopéptido (la poli(DL-alanina)) del que se han transferido un gran número de constantes físicas para determinar los valores de las constantes intrínsecas de intercambio en condiciones nativas.

Como conclusión de especial relevancia de este trabajo podemos decir que las propiedades de intercambio de "el" estado desnaturalizado de la Ribonucleasa A son diferentes bajo condiciones de desnaturalización térmica y bajo condiciones fuertemente

nativas. Un modelo de estado desnaturalizado como el presentado en la Fig. III.19 (Dill & Shortle, 1991), con el nombre de **modelo variable de dos estados** daría cuenta de las discrepancias observadas en este trabajo entre las energías libres de desnaturalización de terminadas calorimétricamente y a partir de datos del intercambio H/D. En el mencionado modelo, las poblaciones de las configuraciones que forman "*el estado desnaturalizado*" cambian en consonancia con las condiciones nativas o desnaturalizantes que se impongan sobre la proteína. Para encontrar un acuerdo entre ambas medidas de energías libres de desnaturalización, se requeriría que las configuraciones del estado desnaturalizado pobladas en condiciones nativas tuviesen cinéticas de intercambio muy protegidas (alrededor de tres órdenes de magnitud) con respecto a los más pobladas en condiciones desnaturalizantes.

Desgraciadamente las contribuciones de la estructura residual del estado desnaturalizado no han podido ser evaluadas con precisión, pero se han establecido varias aproximaciones usando modelos teóricos. El grupo de Richards (Matthew & Richards, 1983) calcularon la contribución del campo electrostático al intercambio, considerando cadenas fijas y con carga constante, concluyendo que estos campos electrostáticos podían elevar ó disminuir las constantes de intercambio del orden de 10 a 100 veces (de hecho ensayaron su método con el S-péptido de la Ribonucleasa S, observando que las diferencias podían ser considerables dentro de la propia hélice). El efecto de las cargas locales efectivas sobre el intercambio ya se discutió para el BPTI, encontrándose serias diferencias si se consideraban éstas ó no (Kim & Baldwin, 1982).

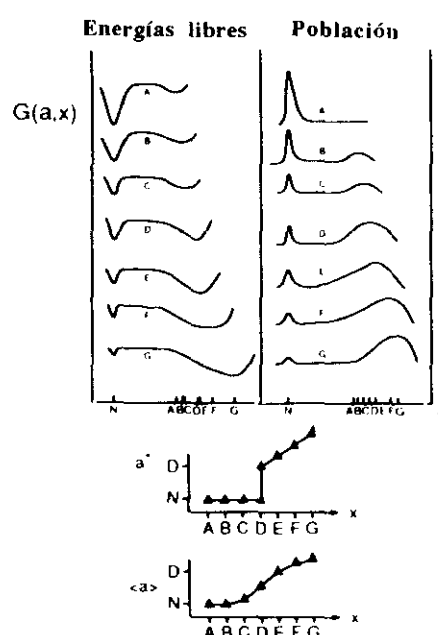


Fig. III.19. : Esquema representando el modelo de dos estados variable (de Dill & Shortle, 1991).

En este trabajo se ha concluido, que en el caso de las Ribonucleasas A y S, para poder explicar las medidas del intercambio H/D es necesario asumir que el estado desnaturalizado presenta conformaciones locales que protegen a los protones del intercambio. Los cálculos teóricos arriba en contrados pueden aportar claves para una explicación definitiva en la discrepancia encontrada.

Capítulo IV

Resumen y conclusiones

En el marco del problema de plegamiento de proteínas, por el que se pretende conocer la estructura tridimensional de éstas a partir de la secuencia, la caracterización estructural y dinámica de los estados nativo y desnaturalizado, así como la de los posibles intermediarios y del estado de transición, es de primordial importancia. Dentro de estas coordenadas se encuentra el trabajo que se expone en la presente Memoria. En concreto, se ha intentado describir la estructura y dinámica de Ribonucleasa A en disolución acuosa y la variación de éstas con el estado de ionización de los distintos grupos ionizables, utilizando la técnica de Resonancia Magnética Nuclear bidimensional (RMN-2D). Para ello, se ha procedido a un estudio experimental en el que se perseguían los siguientes objetivos: (a) la caracterización de los factores de estabilidad y cambios conformacionales con el pH y (b) la descripción de la dinámica de fluctuaciones estructurales del enzima usando las propiedades de intercambio H/D de protones peptídicos individuales.

Para la consecución de dichos objetivos, se han analizado, en primer lugar, los espectros de RMN-2D de Ribonucleasa A a intervalos de 0.5 unidades en el intervalo de $\text{pH} = 2.0$ a $\text{pH} = 8.5$. Ello ha requerido un considerable trabajo de asignación y seguimiento de cada una de las señales protónicas (unas 700) a lo largo de la variación de la acidez del medio. Del análisis de la variación de los desplazamientos químicos con el pH es posible determinar los valores de los pK_a s correspondientes a los equilibrios de ionización de los distintos grupos ionizables presentes en la molécula y proceder a su asignación a residuos concretos. La desviación de los valores de los pK_a s obtenidos en la estructura nativa frente a los aceptados para el estado desnaturalizado permite discriminar la naturaleza de la interacción que la origina y proporciona un valor cuantitativo para la energía libre de estabilización correspondiente a dicha interacción. Las curvas de titulación de los distintos protones permiten caracterizar el efecto de la ionización de un grupo sobre un determinado protón como normal, cooperativo y anticooperativo, lo que es de utilidad para obtener información acerca de las accesibilidades del grupo, del alcance del efecto y de la dependencia de la titulación con otros grupos. La detección de posibles interacciones específicas que contribuyan a la estabilidad del estado nativo y en las que intervengan grupos cargados es otro de los objetivos que pueden realizarse con el presente análisis. Debido a que en estas interacciones intervienen como aceptores de enlaces de hidrógeno grupos no protonados, no es siempre fácil detectar éstas a partir de transferencia de magnetización ^1H - ^1H del tipo NOE. La utilización conjunta de desplazamientos químicos y efectos NOE observados puede permitir una descripción pormenorizada de los posibles cambios conformacionales inducidos por el pH. Por último, la discriminación entre la cinética de interconversión entre estados plegados y desplegados en la escala de tiempos de la espectroscopía de RMN puede permitir la

descripción, en términos estructurales y dinámicos, de un posible intermediario de plegamiento.

En relación con los estados de intercambio y con objeto de describir la dinámica de Ribonucleasa A, se han determinado las cinéticas individuales de intercambio H/D de protones peptídicos, previamente asignados. Las medidas se han realizado a pH = 2.5 y pH = 6.0 para Ribonucleasa A y a pH = 6.0 para Ribonucleasa S, en el intervalo de temperaturas de 288 K a 318 K. Las constantes cinéticas se han obtenido por un ajuste de mínimos cuadrados de las curvas a exponenciales de primer orden que representan la caída de intensidad de las señales de correlación $\text{CH}_\alpha\text{-NH}$ en el espectro de RMN 2D-COSY como una función del tiempo transcurrido desde su disolución en D_2O . De un total de 119 protones peptídicos existentes en la proteína, se han obtenido valores para las constantes cinéticas de intercambio de 80 protones en, al menos, alguna de las condiciones expuestas más arriba. Los restantes protones peptídicos intercambian con una cinética mucho más rápida que el límite superior accesible a las medidas experimentales.

Las medidas a dos diferentes pHs permiten discriminar el tipo de mecanismo de intercambio por el que éste tiene lugar. Dentro del mecanismo EX_2 , la medida de las constantes cinéticas han proporcionado el valor de la energía libre local o global que propicia el intercambio. El estudio a diferentes temperaturas de las constantes cinéticas nos proporciona información acerca de los parámetros de activación y sobre el estado de transición. En el caso de los protones más lentos, que necesitan de una desnaturalización global y cooperativa para poder intercambiar, su energía libre habría de coincidir con las medidas calorimétricas. A la vista de la discrepancia encontrada entre los valores de las energías libres procedentes de medidas de intercambio y los calorimétricos existentes en la bibliografía, llevamos a cabo nuestras propias medidas de calorimetría en idénticas condiciones a como se realizaron las del intercambio. Las transiciones cumplían el modelo de reversibilidad termodinámica y de acuerdo con ello se obtuvieron los parámetros termodinámicos que caracterizan la transición. Los valores de las energías libres extrapoladas a condiciones nativas seguían mostrando una gran discrepancia con los obtenidos de datos del intercambio, lo que se interpretó en términos de un modelo de estado desnaturalizado más elaborado.

Como resultado de estos estudios se han obtenido las siguientes conclusiones:

- 1.- Los valores de los pK_a s de los residuos ionizables de Ribonucleasa A, comprendidos en el intervalo de pH = 1 a pH = 8.5, son los dados en las Tablas III.4 y III.5. Con base en dichos valores, es posible obtener ahora una imagen precisa y pormenorizada de la distribución de la carga eléctrica en el volumen de la

enzima, a cualquier pH, lo que puede servir para estudios teóricos de modelos electrostáticos.

2.- Sobre la base de las grandes variaciones experimentadas por los desplazamientos químicos de los protones implicados, se han detectado: un puente salino (Arg 10 (NH_ϵ^-)- Glu 2 (COO^-)) y cuatro enlaces de hidrógeno (Ser 50 (NH)- Asp 53 (COO^-), Lys 66-Asp 121 (COO^-), Ser 80 (NH)-Glu 49 (COO^-) e His 105-Val 124 (COO^-)) interacciones específicas a medio y largo alcance que contribuyen a reforzar la estabilidad de la estructura nativa de la proteína.

3.- Los cambios conformacionales con el pH propuestos en anteriores estudios, que afectan al entorno de los residuos cargados (Asp 14 e His 48) quedan ahora perfectamente aclarados. En todo el intervalo de pH, el OH fenólico de Tyr 25 y el carboxilato de Asp 14 permanecen unidos por un puente de hidrógeno. A $\text{pH} = 6.0$ con la disociación del grupo imidazólico de His 48 no se produce el cambio aceptado hasta ahora según el cual se rompía el enlace anterior y se formaba el puente de hidrógeno entre el OH de Tyr 25 y el $\text{N}^{\epsilon 2}$ de His 48. El cambio conformacional transcurre tal como se describe en el apartado 2.3.2.. Es de destacar que las variaciones en las posiciones atómicas de los distintos grupos son mínimas.

4.- La cadena lateral de His 119, que interviene en la ligadura del sustrato y la catálisis, puede adoptar dos conformaciones distintas con rápido intercambio dinámico. Estas conformaciones difieren en los valores de las torsiones de χ_1 y χ_2 . Los cambios son concertados de forma que desde ambas posiciones es posible el ataque del $\text{H}^{\epsilon 1}$ a uno de los protones del grupo fosfato del sustrato. Las poblaciones de estas conformaciones son dependientes del pH y de la presencia de fosfato.

5.- Las variaciones observadas en los desplazamientos químicos de protones atribuibles a la carga de un grupo ionizable muestran una dependencia muy específica con la orientación del enlace CH respecto a dicha carga, lo que puede ser en el futuro de gran utilidad en la asignación estereoespecífica de protones geminales y en el proceso de refinamiento de estructuras de RMN.

6.- Las unidades de desnaturalización y las energías libres de sus fluctuaciones estructurales para las Ribonucleasas A y S son las dadas en las Tablas de los apartados 3.3.1, 3.3.2 y 3.3.3. Los datos contenidos en dichas Tablas forman la base estructural y energética para una descripción cuantitativa de la dinámica molecular de estas enzimas. Atendiendo a la relación entre energías libres de

fluctuaciones y elementos estructurales se confirma que las partes no estructurales o giros son las más móviles seguidas de las hélices α y finalmente de las láminas β .

7.- Los resultados obtenidos aquí, concretamente en el mecanismo de disrupción de enlaces de hidrógeno, favorecen el modelo de *unidades de desnaturalización* o de *fluctuaciones globales o locales* frente a los modelos de *penetración*. Ello implica que el enlace de hidrógeno es la causa más importante de protección frente al intercambio.

8.- En todo el rango de pH y temperatura investigados, el mecanismo por el que se produce el intercambio en Ribonucleasa A y Ribonucleasa S es el denominado mecanismo EX₂, según el cual la constante cinética de renaturalización (paso del estado desnaturalizado al nativo) es mucho mayor que la constante intrínseca de intercambio. Ello requiere que la fluctuación conformacional que propicia el intercambio H/D se produzca muchas veces antes de que tenga lugar el intercambio.

9.- El estado desnaturalizado en condiciones nativas no presenta propiedades de intercambio que puedan obtenerse por extrapolación de valores medidos en condiciones de desnaturalización. Ello requiere la adopción de un nuevo modelo de estado desnaturalizado, como el denominado modelo de dos estados variable (Dill & Shortle, 1991). En este modelo, las poblaciones de las configuraciones que forman el estado desnaturalizado cambian según sean las condiciones externas: nativas o desnaturalizantes. Para obtener un acuerdo con nuestros resultados experimentales, las configuraciones del estado desnaturalizado pobladas en condiciones nativas habrían de presentar constantes intrínsecas de intercambio muy ralentizadas (hasta 3 órdenes de magnitud) en relación con las correspondientes a las configuraciones pobladas en condiciones desnaturalizantes.

10.- La comparación de los parámetros de activación de ambas especies, permite describir el estado de activación de ambas y deducir que el valor entrópico del intercambio es muy grande y negativo en Ribonucleasa A, pero no así en la Ribonucleas S, donde los aminoácidos están más accesibles.

11.- Evidencia experimental proveniente tanto del estudio de las variaciones con el pH como del intercambio H/D, sustenta la propuesta de la existencia de un intermediario en el proceso de desnaturalización a pHs ácidos que estaría formado por un núcleo muy estable y de zonas con desplegamiento mucho más locales. El proceso de desnaturalización y formación del intermediario podría estar relacionado con la protonación del Asp 14. Los protones peptídicos del S-péptido, por ejemplo, pertenecerían a la zona lábil, mientras que las cadenas laterales de otros residuos

permanecerían fijas. Estos resultados apoyan la posibilidad de que interacciones terciarias específicas puedan dirigir y generar la localización de elementos de estructura secundaria.

Apéndice

A continuación se exponen las Tablas de las medidas cinéticas y termodinámicas de Ribonucleasas A y S, en las condiciones descritas en este trabajo. Se ha usado el siguiente convenio de símbolos:

(a) Aquellos aminoácidos que llevan como superíndice un asterisco, indica que para ellos existe una medición en la proteína desnaturalizada (Ribonucleasa A; Robertson & Baldwin, 1991) de la constante cinética intrínseca, k_c , que es la que aparece registrada en la columna correspondiente. Para los restantes es el valor obtenido por los modelos teóricos (Molday et al., 1972) el que se usa y aparece tabulado.

(b) Aquellos aminoácidos que en unas determinadas condiciones experimentales, vayan acompañados de las iniciales NM, indica que su constante cinética, k_{ex} , es demasiado lenta para ser medida con la ventana espectral usada, es decir, durante el tiempo de observación no se observó disminución de la intensidad de la misma.

(c) En algunos aminoácidos, no se ha podido determinar su constante cinética, k_{ex} , por:

[1] Poseen una constante de acoplamiento demasiado pequeña.

[2] Se produce el solapamiento con otras señales.

[3] La señal en el COSY resulta eliminada por la irradiación de la señal del agua.

[4] Aparece únicamente una señal en el primer espectro, correspondiente a ese aminoácido, por lo que no es posible un ajuste de la exponencial.

[5] Aminoácidos que desaparecen como consecuencia de algún cambio conformacional con el pH.

Tabla A.1.

Constantes de intercambio, k_{ex} (10^5 min^{-1}) constantes intrínsecas, k_c (10^2 min^{-1}), e ΔG_{op} (Kcal mol^{-1}) de los protones de Ribonucleasa A. Condiciones: 4 mM de proteína, pH =2.5 (tampón de glicina) en 0.2 M de NaCl.

Amino-ácido	288 K			298 K			308 K		
	k_{ex}	k_c	ΔG_{op}	k_{ex}	k_c	ΔG_{op}	k_{ex}	k_c	ΔG_{op}
Lys 1									
Glu 2									
Thr 3	1570	3.9	0.5	183	10.3	2.3			
Ala 4									
Ala 5									
Ala 6	25.9	5.3	2.1	126.2	30.3	3.2	526.0	72.7	3.0
Lys 7		NM		36.9	5.8	2.9	368.0	57.9	3.1
Phe 8		[1]			[1]		134.0	74.4	3.8
Glu 9*		NM			NM		45.0	72.7	4.5
Arg 10*		NM			NM		30.0	57.9	4.6
Gln 11*		NM			NM		42.8	74.4	4.5
His 12		[3]		11.7	63.1	5.0	148.0	156.3	4.2
Met 13		NM			NM		83.2	65.7	4.0
Asp 14		NM		101.7	83.4	3.9	804.0	190.8	3.3
Ser 15									
Ser 16									
Thr 17	405	4.4	1.3	810.0	12.2	1.6			
Ser 18									
Ala 19									
Ala 20									
Ser 21									
Ser 22									
Ser 23									
Asn 24									
Tyr 25		[1]			[1]			[1]	
Cys 26		NM			NM		88.0	21.8	3.3
Asn 27									
Gln 28	9.6	5.1	3.5	19.5	13.1	3.8			
Met 29*		NM			NM			NM	
Met 30		NM			NM			NM	
Lys 31*		NM			NM		13.9	50.8	5.0
Ser 32		[1]			[1]			[1]	
Arg 33	305.0	2.0	1.0	55.3	5.3	2.7	173.0	13.1	2.6
Asn 34*		[3]		49.7	46.0	4.0	218.0	108.7	3.8
Leu 35	84.9	5.9	2.4	230.2	14.9	2.4	1596.0	35.1	1.8
Thr 36	122.4	3.8	1.9	543.1	9.8	1.7			
Lys 37									
Asp 38									
Arg 39									
Cys 40									
Lys 41									
Pro 42									
Val 43*	15.0	2.1	2.8	38.2	5.5	2.9	83.1	13.1	3.0
Asn 44		[3]			NM		29.8	36.7	4.3
Thr 45									
Phe 46*					NM		10.8	30.6	4.8
Val 47		NM			NM			NM	
His 48		NM			NM		87.0	118.2	4.4
Glu 49				76.6	35.3	3.6	270.0	87.6	3.5
Ser 50									
Leu 51	104.6	2.9	1.9		[4]				
Ala 52	142.8	5.3	2.0	587.3	13.1	1.8			
Asp 53	32.7	12.1	3.3	200.5	31.2	2.9	1430.0	74.8	2.4
Val 54*		NM			NM		7.6	10.4	4.4
Gln 55*		NM			NM		16.9	49.7	4.8
Ala 56*		NM			NM		40.7	32.5	4.1
Val 57*		NM			NM			NM	
Cys 58*		NM			NM		10.7	37.9	4.9
Ser 59*		NM		19.9	20.5	4.1	61.5	50.2	4.1
Gln 60*		NM			NM		16.4	53.9	4.9

Amino- ácido	288 K			298 K			308 K		
	k_{ex}	k_c	ΔG_{op}	k_{ex}	k_c	ΔG_{op}	k_{ex}	k_c	ΔG_{op}
Lys 61*		NM		92.6	14.6	2.9	205.0	35.2	3.1
Asn 62	159.5	4.9	1.1		[4]				
Val 63*		NM			NM		6.6	12.8	4.6
Ala 64									
Cys 65	295.2	3.8	1.4	848.4	9.8	1.5	1160.0	23.6	1.8
Lys 66									
Asn 67									
Gly 68									
Gln 69	155.0	5.9	2.1	160.7	14.9	2.6			
Thr 70	192.3	3.9	1.7	533.0	10.4	1.7			
Asn 71		[2]		635.1	12.5	1.7			
Cys 72*		NM			NM		16.3	34.9	4.6
Tyr 73*		NM			NM		8.5	23.0	4.8
Gln 74*		NM			NM		7.9	35.5	5.1
Ser 75		NM			NM		2910.0	25.2	1.3
Tyr 76		[2]			[2]			[2]	
Ser 77									
Thr 78									
Met 79*		NM			NM		11.1	42.4	5.0
Ser 80		[3]		176.4	9.8	2.3	860	23.6	2.0
Ile 81*		NM			NM		3.7	15.0	5.0
Thr 82*		NM			NM			NM	
Asp 83		NM		8.2	38.6	4.9	65.2	95.2	4.4
Cys 84*		NM			NM		22.9	55.7	4.7
Arg 85*		NM			NM		12.7	46.5	5.0
Glu 86									
Thr 87		NM		53.5	10.4	3.1	370.0	25.2	2.5
Gly 88									
Ser 89									
Ser 90									
Lys 91	190.2	2.1	1.4	86.5	5.6	2.4			
Tyr 92									
Pro 93									
Asn 94				661.7	15.7	1.8	435.0	36.7	2.7
Cys 95	82.5	7.1	2.5		[4]				
Ala 96	231.1	2.9	1.4		[4]				
Tyr 97*		NM			NM		23.9	20.4	4.1
Lys 98*					NM		12.7	44.7	4.9
Thr 99	196.5	4.6	1.8	1187.9	12.4	1.4			
Thr 100*		NM			NM		15.1	81.4	5.2
Gln 101	86.1	2.7	1.9		[4]				
Ala 102*		[3]		6.6	9.6	4.3	34.5	65.3	4.6
Asn 103	263.9	6.2	1.8	288.4	15.6	2.3			
Lys 104		[3]			NM		22.8	21.4	4.1
His 105	156.3	31.6	3.0	344.6	86.4	3.2			
Ile 106*		NM			NM		5.2	15.8	4.9
Ile 107		NM			NM			[2]	
Val 108*		NM			NM			NM	
Ala 109*		NM			NM		4.0	17.6	5.1
Cys 110		NM			NM			[2]	
Glu 111*		NM			NM		29.6	57.1	4.6
Gly 112	169.4	4.8	1.9	627.9	12.4	1.7			
Asn 113	138.4	9.7	2.4		[4]				
Pro 114									
Tyr 115									
Val 116*		NM			NM		4.9	5.6	4.2
Pro 117									
Val 118*		NM			NM			NM	
His 119		NM			NM		76.7	118.2	4.4
Phe 120		NM			NM				
Asp 121	20.1	10.7	3.5	103.8	28.3	3.3	631.2	69.2	2.8
Ala 122									
Ser 123	333.4	3.8	1.4	503.0	9.8	1.7			
Val 124	197.7	3.1	1.5	636.4	7.9	1.5	320.0	18.8	2.5

Tabla A.2.

Energías libres de transición, ΔG^\ddagger (Kcal mol⁻¹), y energías de activación, E_a (Kcal mol⁻¹) de los protones de Ribonucleasa A.
Condiciones: 4 mM de proteína, pH =2.5 (tampón de glicina) en 0.2 M de NaCl.

Residuo	288 K	298 K	308 K	E_a	Residuo	288 K	298 K	308 K	E_a
Lys 1					Val 63*	NM	NM	26.3	
Glu 2					Ala 64				
Thr 3	21.5	23.5			Cys 65	22.4	22.6	23.2	12.1
Ala 4					Lys 66				
Ala 5					Asn 67				
Ala 6	23.8	23.7	23.7	26.4	Gly 68				
Lys 7	NM	24.4	23.9		Gln 69	22.8	23.6		
Phe 8	[1]	[1]	22.0		Thr 70	22.7	22.8		
Glu 9*	NM	NM	25.2		Asn 71	[2]	[2]	[2]	
Arg 10*	NM	NM	25.4		Cys 72*	NM	NM	25.8	
Gln 11*	NM	NM	25.2		Tyr 73*	NM	NM	26.2	
His 12	[1]	25.1	24.4		Gln 74*	NM	NM	26.2	
Met 13	NM	NM	24.8		Ser 75	NM	NM	22.6	
Asp 14	NM	23.7	23.4		Tyr 76	[2]	[2]	[2]	
Ser 15					Ser 77				
Ser 16					Thr 78				
Thr 17	22.2	22.6			Met 79*	NM	NM	26.0	
Ser 18					Ser 80	[3]	23.5	23.4	
Ala 19					Ile 81*	NM	NM	26.7	
Ala 20					Thr 82*	NM	NM	NM	
Ser 21					Asp 83	NM	25.3	24.9	
Ser 22					Cys 84*	NM	NM	23.9	
Ser 23					Arg 85*	NM	NM	25.9	
Asn 24					Glu 86	[1]	[1]	[1]	
Tyr 25	[1]	[1]	[1]		Thr 87	NM	24.2	23.8	
Cys 26	NM	NM	24.7		Gly 88				
Asn 27					Ser 89				
Gln 28	24.4	24.8			Ser 90				
Met 29*	NM	NM	NM		Lys 91	22.7	23.9		
Met 30	NM	NM	NM		Tyr 92	[1]	[1]	[1]	
Lys 31*	NM	NM	25.9		Pro 93				
Ser 32	[1]	[1]	[1]		Asn 94	[2]	[2]	[2]	
Arg 33	22.4	24.2	24.3		Cys 95	23.1	[4]		
Asn 34*	[3]	24.3	24.2		Ala 96	22.5	[4]		
Leu 35	23.1	23.3	23.0	25.6	Tyr 97*	NM	NM	25.5	
Thr 36	22.9	22.8			Lys 98*	NM	NM	25.9	
Lys 37					Thr 99	22.6	25.1		
Asp 38					Thr 100*	NM	NM	25.8	
Arg 39					Gln 101	23.1	[4]		
Cys 40					Ala 102*	NM	25.4	25.3	
Lys 41					Asn 103	22.5	23.2		
Pro 42					Lys 104	NM	NM	25.6	
Val 43*	24.1	24.4	24.8	15.1	His 105	22.8	23.1		
Asn 44					Ile 106*	NM	NM	26.5	
Thr 45					Ile 107	NM	NM	[2]	
Phe 46*					Val 108*	NM	NM	NM	
Val 47					Ala 109*	NM	NM	26.6	
His 48					Cys 110	NM	NM	[2]	
Glu 49					Glu 111	NM	NM	25.4	
Ser 50					Gly 112	22.7	22.8		
Leu 51	23.0	[4]			Asn 113	22.8	[4]		
Ala 52	22.8	22.8			Pro 114				
Asp 53	23.7	23.4	23.0	33.1	Tyr 115				
Val 54*	NM	NM	26.3		Val 116	NM	NM	26.5	
Gln 55*	NM	NM	25.7		Pro 117				
Ala 56*	NM	NM	25.2		Val 118	NM	NM	NM	
Val 57*	NM	NM	NM		His 119	NM	NM	24.8	
Cys 58*	NM	NM	26.0		Phe 120				
Ser 59*	NM	24.8	24.9		Asp 121	23.9	23.8	23.5	
Gln 60*	NM	NM	25.8		Ala 122				
Lys 61*	NM	23.9	24.2		Ser 123	22.3	22.9		
Asn 62	22.7	[4]			Val 124	22.6	22.7		

Tabla A.3.

Constantes de intercambio, k_{ex} (10^5 min^{-1}) constantes intrínsecas, k_c (min^{-1}), e ΔG_{op} (Kcal mol^{-1}) de los protones de Ribonucleasa A. Condiciones: 4 mM de proteína, pH =6.0 (tampón de fosfato) en 0.2 M de NaCl.

Amino-ácido	298 K			308 K			313 K			318 K		
	k_{ex}	k_c	ΔG_{op}	k_{ex}	k_c	ΔG_{op}	k_{ex}	k_c	ΔG_{op}	k_{ex}	k_c	ΔG_{op}
Lys 1												
Glu 2												
Thr 3												
Ala 4												
Ala 5												
Ala 6												
Lys 7												
Phe 8		[1]			[1]			[1]			[1]	
Glu 9*												
Arg 10*	84.5	505.4	7.8	713.7	1259.4	7.4						
Gln 11*		NM		20.1	1477.6	9.6	72.7	2257.0	9.2	219.8	3908.4	9.0
His 12	6.4	335.7	9.1	12.2	834.7	9.6	47.1	1275.1	9.2	370.3	1907.9	8.3
Met 13		NM		10.7	514.7	9.4	41.8	786.2	8.9	145.8	1176.4	8.5
Asp 14		[4]		784.2	166.5	6.1						
Ser 15												
Ser 16												
Thr 17												
Ser 18												
Ala 19												
Ala 20												
Ser 21												
Ser 22												
Ser 23												
Asn 24												
Tyr 25		[1]			[1]			[1]			[1]	
Cys 26												
Asn 27												
Gln 28												
Met 29*		[1]		501.1	316.1	6.7						
Met 30		NM			NM			[1]		189.2	302.4	7.5
Lys 31*												
Ser 32		[1]			[1]			[1]			[1]	
Arg 33												
Asn 34*												
Leu 35												
Thr 36												
Lys 37												
Asp 38												
Arg 39												
Cys 40												
Lys 41												
Pro 42												
Val 43*	131.6	72.4	6.4	909.2	180.5	6.0						
Asn 44		[3]			[3]		481.0	507.6	7.1			
Thr 45												
Phe 46*		[5]			[5]			[5]				
Val 47		[5]			[5]			[5]				
His 48		[5]			[5]			[5]				
Glu 49	46.8	370.6	8.0	212.1	923.7	7.9	270.8	1411.0	8.2	422.2	2111.4	8.2
Ser 50												
Leu 51												
Ala 52												
Asp 53												
Val 54*		NM			NM		13.6	351.8	9.1	31.2	247.9	8.5
Gln 55*		NM			NM			[1]		35.7	1266.6	9.4
Ala 56*	48.1	120.9	7.3	163.8	301.1	7.4	172.3	459.9	7.7	598.9	671.9	7.3
Val 57*		NM			NM		8.2	211.8	9.1	11.6	411.5	9.4
Cys 58*		NM			NM		12.1	1453.2	10.1	25.6	2038.9	10.0
Ser 59*	128.7	503.4	7.6	869.5	1254.7	7.3						
Gln 60*	119.7	456.4	7.6	767.9	1139.1	7.2						

Amino-ácido	298 K			308 K			313 K			318 K		
	k _{ex}	k _c	ΔG _{op}	k _{ex}	k _c	ΔG _{op}	k _{ex}	k _c	ΔG _{op}	k _{ex}	k _c	ΔG _{op}
Lys 61*	928.9	302.2	6.1	1337.0	753.3	6.7						
Asn 62												
Val 63*		NM			NM		12.4	396.7	9.3	23.1	580.1	9.2
Ala 64												
Cys 65												
Lys 66												
Asn 67												
Gly 68												
Gln 69												
Thr 70												
Asn 71												
Cys 72*	75.1	353.9	7.7	124.0	882.2	8.2	155.2	1347.5	8.4	671.6	1892.9	7.9
Tyr 73*		NM			NM		10.9	883.1	9.8	26.8	1069.8	9.3
Gln 74*		NM			NM		9.7	775.9	9.8	27.9	1113.1	9.3
Ser 75												
Tyr 76												
Ser 77												
Thr 78												
Met 79*		NM			NM			[3]		27.2	2423.2	10.0
Ser 80												
Ile 81*		[5]			[5]			[5]			[5]	
Thr 82*		[5]			[5]			[5]			[5]	
Asp 83		[5]			[5]			[5]			[5]	
Cys 84*		NM		14.2	1500.5	9.8	27.5	2293.7	9.8	84.7	3005.1	9.4
Arg 85*	42.7	537.5	8.3	66.7	1293.8	8.8	89.3	1976.2	9.0	250.9	3158.5	8.8
Glu 86		[1]			[1]			[1]			[1]	
Thr 87												
Gly 88												
Ser 89												
Ser 90												
Lys 91												
Tyr 92		[1]			[1]			[1]			[1]	
Pro 93												
Asn 94												
Cys 95												
Ala 96		[3]										
Tyr 97*												
Lys 98*	11.4	480.4	9.0	20.5	1203.8	9.5	34.6	1838.8	9.6	117.1	3299.6	9.3
Thr 99												
Thr 100*	38.4	991.5	8.7	75.3	2469.8	9.1		[3]		308.7	5488.6	9.0
Gln 101												
Ala 102*		NM			NM			[3]		46.9	3320.3	9.9
Asn 103												
Lys 104		NM			NM		14.7	717.0	9.5	113.2	1072.9	8.6
His 105												
Ile 106*		NM			NM		6.5	1407.0	9.9	160.4	901.9	9.7
Ile 107		NM			NM		11.4	202.1	8.9	28.8	302.4	8.7
Val 108*		NM			NM		1.9	269.0	10.2	6.1	489.7	10.0
Ala 109*		NM			NM		4.0	303.0	9.8	10.2	405.7	9.5
Cys 110		NM			NM		905.0	639.0	6.9	28.8	956.2	9.4
Glu 111*	27.6	608.6	8.6	87.3	1522.5	8.7	110.4	2325.6	9.0	366.1	366.1	8.6
Gly 112												
Asn 113												
Pro 114												
Tyr 115												
Val 116*		NM			NM		5.0	102.9	9.0	9.4	149.2	8.9
Pro 117												
Val 118*		NM			NM		3.9	140.5	9.3	3.8	194.2	9.7
His 119		NM			NM		14.1	1877.3	10.1	62.4	2757.8	9.6
Phe 120												
Asp 121												
Ala 122												
Ser 123												
Val 124	0.7	4.7	7.9	1242.0	11.8	4.1						

Tabla A.4.

Constantes de intercambio, k_{ex} (10^5 min^{-1}) constantes intrínsecas, k_c (min^{-1}), e ΔG_{op} (Kcal mol^{-1}) de los protones de Ribonucleasa S. Condiciones: 4 mM de proteína, pH ≈ 6.0 (tampón de fosfato) en 0.2 M de NaCl.

Amino-ácido	288 K			298 K			308 K			313 K		
	k_{ex}	k_c	ΔG_{op}	k_{ex}	k_c	ΔG_{op}	k_{ex}	k_c	ΔG_{op}	k_{ex}	k_c	ΔG_{op}
Lys 1												
Glu 2												
Thr 3												
Ala 4												
Ala 5												
Ala 6												
Lys 7												
Phe 8												
Glu 9*												
Arg 10*												
Gln 11*												
His 12		[3]										
Met 13	273.0	7.3	5.8									
Asp 14		[3]										
Ser 15												
Ser 16												
Thr 17												
Ser 18												
Ala 19												
Ala 20												
Ser 21												
Ser 22												
Ser 23												
Asn 24												
Tyr 25												
Cys 26												
Asn 27												
Gln 28												
Met 29*	211.0	46.9	5.7	273.3	128.7	6.3	255.0	316.1	7.1			
Met 30		NM		48.3	53.1	6.8	396.0	132.3	6.3			
Lys 31*	225.0	24.3	6.3									
Ser 32												
Arg 33	151.0	48.6	5.9	554.0	133.3	5.9		[4]				
Asn 34*												
Leu 35												
Thr 36												
Lys 37												
Asp 38												
Arg 39												
Cys 40												
Lys 41												
Pro 42												
Val 43*	141.0	26.4	5.6	458.0	72.4	5.7	873.0	180.5	6.0		[4]	
Asn 44		[3]		59.8	133.3	7.2		[4]				
Thr 45												
Phe 46*		[3]			NM		362.0	755.6	7.4		[4]	
Val 47*		NM		159.0	116.7	6.6		[4]				
His 48		NM		675.0	1333.5	7.2		[4]			[4]	
Glu 49	15.6	135.2	7.8	111.0	370.6	7.5	1120	923.7	6.9			
Ser 50												
Leu 51												
Ala 52												
Asp 53												
Val 54*		NM			NM		125.0	230.3	7.4	913.0	351.8	6.5
Gln 55*		NM			NM		131.0	535.8	7.8			
Ala 56*		NM		154.0	120.9	6.6		[4]				
Val 57*		NM			NM		243.0	191.0	6.8			
Cys 58*		NM			NM		273.0	951.4	9.8			
Ser 59*	175.0	183.6	6.6	494.0	503.4	6.8		[3]			[4]	
Gln 60*	21.8	166.7	7.9	123.0	457.0	7.6	1110.0	1139.1	7.0			

Amino-ácido	288 K			298 K			308 K			313 K		
	k _{ex}	k _c	ΔG	k _{ex}	k _c	ΔG _{op}	k _{ex}	k _c	ΔG _{op}	k _{ex}	k _c	ΔG _{op}
Lys 61*	93.3	110.2	6.6	570.0	302.2	6.4	1750.0	753.3	6.5			
Asn 62												
Val 63*		NM		8.8	104.2	8.2	255.0	259.7	7.0	1390.0	396.7	6.4
Ala 64												
Cys 65												
Lys 66												
Asn 67												
Gly 68												
Gln 69												
Thr 70												
Asn 71												
Cys 72*		NM		31.4	353.9	8.2	459.0	882.2	7.4		[4]	
Tyr 73*		NM			NM		363.0	545.4	7.2	2893.4	883.1	6.4
Gln 74*		NM			NM		395.0	507.5	7.2	1410.0	775.9	6.7
Ser 75												
Tyr 76												
Ser 77												
Thr 78												
Met 79*		NM		12.8	1142.5	8.9		[4]			[4]	
Ser 80												
Ile 81*		NM		7.54	138.6	8.5	333.0	345.4	7.0	2380.0	527.6	6.2
Thr 82*		NM		84.3	218.7	7.3	824.0	545.1	6.7	3000	883.1	6.3
Asp 83												
Cys 84*		NM		11.3	602.5	9.2	466.0	1500.5	7.7	1583.3	2293.7	7.3
Arg 85*		NM		24.0	537.5	8.7	353.0	1293.8	7.8	1827.0	1976.2	7.2
Glu 86		[2]			[2]			[2]			[2]	
Thr 87												
Gly 88												
Ser 89												
Ser 90												
Lys 91												
Tyr 92												
Pro 93												
Asn 94												
Cys 95												
Ala 96												
Tyr 97*		NM			NM		320.0	300.3	6.9			
Lys 98*		NM		25.9	480.4	8.5	457.0	1203.8	7.6	2322.0	1838.8	7.0
Thr 99												
Thr 100*		NM		45.8	991.5	8.6	580.0	2469.8	7.9	552.6	3772.6	8.3
Gln 101												
Ala 102*		NM		51.5	606.7	8.2	667.0	1512.0	7.5			
Asn 103												
Lys 104		[3]		26.1	188.3	7.9	594.0	469.4	6.8			
His 105												
Ile 106*		NM		10.6	163.6	8.4	319.0	427.2	7.2	1407.0	622.8	6.6
Ile 107		NM			NM			[2]			[2]	
Val 108*		NM			NM		116.0	176.1	7.2	896.0	269.0	6.4
Ala 109*		NM			NM		206.0	198.4	7.0	1430.0	303.0	6.2
Cys 110	35.0	61.2	6.8	124.0	167.8	6.9		[2]			[2]	
Glu 111*		NM		27.3	608.6	8.6	215.0	1522.5	8.2			
Gly 112												
Asn 113												
Pro 114												
Tyr 115												
Val 116*		NM			NM		94.3	67.4	6.8	751.0	102.9	5.9
Pro 117												
Val 118*		NM			NM		127.0	91.9	6.8	826.0	140.5	5.7
His 119	19.9	176.5	7.8	154.0	493.1	7.4	1070.0	1129.0	7.0			
Phe 120												
Asp 121												
Ala 122												
Ser 123												
Val 124	205.0	1.7	3.8		[2]		1330.0	11.8	4.1		[4]	

Tabla A.5.

Energías libres de formación del estado activado (ΔG^\ddagger), diferencias en ambas especies ($\Delta\Delta G^\ddagger$) y energías de activación (E_a) en Ribonucleasas A y S. Todas en Kcal mol⁻¹. Condiciones: 4 mM de proteína, pH =6.0 (tampón de fosfato) en 0.2 M de NaCl.

Aminoácido	ΔG^\ddagger_A					ΔG^\ddagger_S					$\Delta\Delta G^\ddagger_{A-S}$		
	298 K	308 K	313 K	318 K	E_a	288 K	298 K	308 K	313 K	E_a	298 K	308 K	313 K
Lys 1													
Glu 2													
Thr 3													
Ala 4													
Ala 5													
Ala 6													
Lys 7													
Phe 8	[1]	[1]	[1]	[1]									
Glu 9*													
Arg 10*	23.9	23.5											
Gln 11*	NM	25.6	25.3	25.0	46.4								
His 12	25.5	25.9	25.5	24.7	35.4	[3]							
Met 13	NM	26.0	25.6	25.2	50.6	22.4							
Asp 14	[4]	23.4				[3]							
Ser 15													
Ser 16													
Thr 17													
Ser 18													
Ala 19													
Ala 20													
Ser 21													
Ser 22													
Ser 23													
Asn 24													
Tyr 25	[1]	[1]	[1]	[1]									
Cys 26													
Asn 27													
Gln 28													
Met 29*	[1]	23.7				22.6	23.2	24.1		1.7		-0.4	
Met 30	NM	NM	NM	25.1		NM	24.3	23.8					
Lys 31*						22.6	23.0						
Ser 32	[1]	[1]	[1]	[1]									
Arg 33						22.8	22.9	[4]					
Asn 34*													
Leu 35													
Thr 36													
Lys 37													
Asp 38													
Arg 39													
Cys 40													
Lys 41													
Pro 42													
Val 43*	23.7	23.3				22.8	22.9	23.3	[4]	16.1	0.8	0.0	
Asn 44	[3]	[3]	24.1			NM	24.1	[4]					
Thr 45													
Phe 46*	[5]	[5]	[5]	[5]		NM	NM	23.9					
Val 47	[5]	[5]	[5]	[5]		NM	23.6	[4]					
His 48	[5]	[5]	[5]	[5]		NM	22.7	[4]	[4]				
Glu 49	24.3	24.2	24.5	24.6	20.6	24.1	23.8	23.2		37.5	0.5	1.0	
Ser 50													
Leu 51													
Ala 52													
Asp 53													
Val 54*	NM	NM	26.3	26.2		NM	NM	24.5	23.7				2.6
Gln 55*	NM	NM	[1]	26.1		NM	NM	24.5					
Ala 56*	24.3	24.4	24.7	24.4	21.6	NM	23.6	[4]			0.7		
Val 57*	NM	NM	26.6	26.8		NM	NM	24.1					
Cys 58*	NM	NM	26.4	26.3		NM	NM	24.1					
Ser 59*	23.7	23.3				22.7	22.9	[3]	[4]		0.8		
Gln 60*	23.7	23.4				23.9	23.7	23.2		34.3	0.0	0.2	

Aminoá- cido	ΔG°_A					ΔG°_S					$\Delta \Delta G^{\circ}_{A-S}$		
	298 K	308 K	313 K	318 K	E _a	288 K	298 K	308 K	313 K	E _a	298 K	308 K	313 K
Lys 61*	22.5	23.1				23.1	22.8	22.9		25.7	-0.3	0.2	
Asn 62													
Val 63*	NM	NM	26.4	22.8		NM	25.3	24.1	23.3	62.0			2.9
Ala 64													
Cys 65													
Lys 66													
Asn 67													
Gly 68													
Gln 69													
Thr 70													
Asn 71													
Cys 72*	24.0	24.5	24.8	24.3	78.1	NM	24.5	23.7	[4]		-0.5	0.8	
Tyr 73*	NM	NM	26.4	26.3		NM	NM	23.9	23.0				3.4
Gln 74*	NM	NM	26.5	26.3		NM	NM	23.8	23.4				3.1
Ser 75													
Tyr 76													
Ser 77													
Thr 78													
Met 79*	NM	NM	[1]	26.3		NM	25.1	[4]	[4]				
Ser 80													
Ile 81*	[5]	[5]	[5]	[5]		NM	25.4	24.0	23.1	70.5			
Thr 82*	[5]	[5]	[5]	[5]		NM	23.9	23.4	22.9	43.5			
Asp 83	[5]	[5]	[5]	[5]									
Cys 84*	NM	25.8	25.9	25.6	34.5	NM	25.1	23.7	23.4	61.8		2.1	2.1
Arg 85*	24.3	24.9	25.1	24.9	15.0	NM	24.7	23.9	23.3	52.5	-0.4	1.0	1.8
Glu 86	[1]	[1]	[1]	[1]		[1]	[2]	[1]	[2]				
Thr 87													
Gly 88													
Ser 89													
Ser 90													
Lys 91													
Tyr 92													
Pro 93													
Asn 94													
Cys 95													
Ala 96	[3]	25.5											
Tyr 97*						NM	NM	23.9					
Lys 98*	25.1	25.6	25.7	25.4	20.1	NM	24.6	23.7	23.1	65.7	1.0	1.1	2.6
Thr 99													
Thr 100*	24.4	24.8	[3]	24.8	19.4	NM	24.3	23.6	24.0	33.0	0.5	1.2	
Gln 101													
Ala 102*	NM	NM	[3]	25.9		NM	24.3	23.6					
Asn 103													
Lys 104	NM	NM	25.2	25.4		[3]	24.2	23.6					
His 105													
Ile 106*	NM	NM	26.8	26.6		NM	25.1	24.0	23.5	51.8			3.3
Ile 107	NM	NM	26.4	26.3		NM	NM	[2]	[2]				
Val 108*	NM	NM	27.5	27.2		NM	NM	24.6	23.7				3.8
Ala 109*	NM	NM	27.1	26.9		NM	NM	24.2	23.5				3.7
Cys 110	NM	NM	23.7	26.3		23.6	23.7	[2]	[2]				
Glu 111*	24.6	24.7	25.0	24.7	22.5	NM	24.6	24.2			0.0	0.5	
Gly 112													
Asn 113													
Pro 114													
Tyr 115													
Val 116*	NM	NM	26.9	27.0		NM	NM	24.7	23.8				3.1
Pro 117													
Val 118*	NM	NM	27.1	27.5		NM	NM	24.5	23.8				
His 119	NM	NM	26.3	25.8		23.9	23.6	23.2		34.8			
Phe 120													
Asp 121													
Ala 122													
Ser 123													
Val 124	26.8	23.1				22.6	[2]	23.1	[2]			0.0	

Tabla A.6.

Constantes de intercambio, k_{ex} (10^5 min^{-1}) constantes intrínsecas, k_c (min^{-1}), e ΔG_{op} (Kcal mol^{-1}) a pH = 5.4 (tampón de fosfato) y clasificación de los protones de Ribonucleasa A. Condiciones: 4 mM de proteína, 0.2 M de NaCl y 308 K.

Aminoácido	k_{ex}	k_c	ΔG_{op}	Estructura	Tipo	Aminoácido	k_{ex}	k_c	ΔG_{op}	Estructura	Tipo
Lys 1					V	Val 63*		NM		$\beta 2$	I
Glu 2					V	Ala 64				$\beta 2$	V
Thr 3				α	V	Cys 65				Giro β	IV
Ala 4				α	V	Lys 66				Giro β	V
Ala 5				α	V	Asn 67				Giro β	V
Ala 6				α	IV	Gly 68				Giro β	V
Lys 7				α	IV	Gln 69				Giro β	V
Phe 8				α	IV	Thr 70				Giro β	V
Glu 9				α	IV	Asn 71				$\beta 3$	V
Arg 10*	120.0	41.8	7.6	α	IV	Cys 72*	28.2	296.2	8.2	$\beta 3$	II
Gln 11*		NM		α	II	Tyr 73*		NM		$\beta 3$	I
His 12	19.3	209.7	8.4	α	IV	Gln 74*		NM		$\beta 3$	III
Met 13		NM		α	II	Ser 75				($\beta 4$)	III
Asp 14	315.9	41.8	5.8		IV	Tyr 76				($\beta 4$)	V
Ser 15					V	Ser 77				($\beta 4$)	V
Ser 16					V	Thr 78				($\beta 4$)	V
Thr 17					IV	Met 79*		NM		($\beta 4$)	I
Ser 18					V	Ser 80				$\beta 4$	V
Ala 19					V	Ile 81*				$\beta 4$	I
Ala 20					V	Thr 82*				$\beta 4$	III
Ser 21					V	Asp 83	581.3	83.4	5.8	$\beta 4$	IV
Ser 22					V	Cys 84*	11.9	526.7	9.1	$\beta 4$	I
Ser 23				α	V	Arg 85*	17.0	83.4	8.9	$\beta 4$	II
Asn 24				α	V	Glu 86				$\beta 4$	V
Tyr 25				α	V	Thr 87				$\beta 4$	IV
Cys 26				α	V	Gly 88				Giro β	V
Asn 27				α	V	Ser 89				Giro β	V
Gln 28				α	V	Ser 90				Giro β	V
Met 29*	139.2	46.9	6.7	α	IV	Lys 91				Giro β	V
Met 30		NM		α	III	Tyr 92				Giro β	V
Lys 31*	889.8	41.8	6.2	α	IV	Pro 93				Giro β	
Ser 32				α	V	Asn 94				Giro β	V
Arg 33				α	IV	Cys 95				Giro β	V
Asn 34*				α	IV	Ala 96				$\beta 5$	V
Leu 35				α	IV	Tyr 97*	1458.5	26.4	5.2	$\beta 5$	IV
Thr 36					V	Lys 98*	5.4	52.6	9.4	$\beta 5$	II
Lys 37					V	Thr 99				$\beta 5$	V
Asp 38					V	Thr 100*				$\beta 5$	IV
Arg 39					V	Gln 101				$\beta 5$	V
Cys 40					V	Ala 102*				$\beta 5$	I
Lys 41					V	Asn 103				$\beta 5$	V
Pro 42				$\beta 1$		Lys 104		NM		$\beta 5$	III
Val 43*	330.6	33.2	5.8	$\beta 1$	IV	His 105				$\beta 6$	V
Asn 44	73.6	83.4	7.1	$\beta 1$	IV	Ile 106*		NM		$\beta 6$	I
Thr 45				$\beta 1$	V	Ile 107		NM		$\beta 6$	III
Phe 46*		NM		$\beta 1$	II	Val 108*		NM		$\beta 6$	I
Val 47				$\beta 1$	II	Ala 109*		NM		$\beta 6$	I
His 48				$\beta 1$	IV	Cys 110	327.5	105.1	6.3	$\beta 6$	III
Glu 49	175.9	232.0	7.2	$\beta 1$	II	Glu 111*	24.5	66.3	8.7	$\beta 6$	II
Ser 50				α	V	Gly 112				Giro β	V
Leu 51				α	V	Asn 113				Giro β	V
Ala 52				α	V	Pro 114				Giro β	
Asp 53				α	IV	Tyr 115				Giro β	V
Val 54*		NM		α	II	Val 116*				$\beta 7$	III
Gln 55*		NM		α	I	Pro 117				$\beta 7$	
Ala 56*		NM		α	III	Val 118*		NM		$\beta 7$	I
Val 57*		NM		α	I	His 119		NM		$\beta 7$	I
Cys 58*		NM		α	I	Phe 120				$\beta 7$	V
Ser 59*	109.5	209.7	7.6	α	IV	Asp 121				$\beta 7$	IV
Gln 60*	135.3	93.6	7.4	α	IV	Ala 122				$\beta 7$	V
Lys 61*	307.9	59.1	6.7	$\beta 2$	IV	Ser 123				$\beta 7$	IV
Asn 62				$\beta 2$	V	Val 124	265.0	2.9	4.3	$\beta 7$	IV

Bibliografía

Abildgaard, F., Jørgensen, A.M. M., Led, J.J., Christensen, T., Jensen, E. B., Junker, F. & Dalbøge, H. (1992) *Biochemistry* **31**, 8587-8596.

Andria, G. & Taniuchi, H. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 2262-2270.

Anfinsen, C. B., Haber, E., Sela, M. & White, F. H. (1961) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **47**, 1309-1315

Aue, W. P., Bartoldi, E. & Ernst, E.E. (1976) *J. Chem. Phys.* **64**, 2229-2246.

Bashdford, D. (1991) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1**, 175-184.

Battistel, E. , Bianchi, D. & Rialdi, G. (1991) *Pure & Appl. Chem.* **63**, 1483-1490.

Bauer, C.J., Freeman, R., Frenkiel, T., Keeler, J. & Shaka, A.J. (1984) *J. Mag. Reson.* **58**, 442-457.

Bax, A. & Davies, D.G. (1985 a) *J. Magn. Reson.* **65**, 355-360.

Bax, A. & Davies, D.G. (1985 b) *J. Magn. Reson.* **63**, 207-213.

Beintema, J. J., Schüller, C. Irie, M. & Carsana, A. (1988) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **51**, 165-215.

Blanco, F.J. (1992) *Papel de los giros β en el plegamiento de proteínas. Estudio por Resonancia Magnética Nuclear*, Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

Bodenhausen, G., Vold, R. L. & Vold, R.R. (1980) *J. Magn. Reso.* **37**, 93-106.

Borkakoti, N., Moss, D. S. & Palmer, R. A. (1982) *Acta Cryst.* **B38**, 2210-2217.

Braun, W (1987) *Q. Rev. Biophys.* **19**, 115-157.

Braunschweiler, L. & Ernst, R.R. (1983) *J. Magn. Reson.* **53**, 521-528.

Brems, D.N. & Baldwin, R.L. (1985) *Biochemistry* **24**, 1689-1693.

Cantor, C. R. & Schimmel, P. R. (1980) *Biophysical Chemistry (Volumen I)*, W. H. Freeman, New York.

Clore, G. M. & Gronenborn, A. M. (1991) *Science* **252**, 1390-1399.

- Covington, A. K., Robinson, R.A. & Bates, R.G. (1966) *J. Phys. Chem.* **70**, 3820-3824.
- Crighton, T.E. (1989) *Proteins*, W. H. Freeman, New York.
- Delapierre, M, Dobson, C. M, Karplus, M, Poulsen, F. M, States, D. J. & Wedin, R.E. (1987) *J. Mol. Biol.* **197**, 111-130.
- Dill, K. A & Shortle, D. (1991) *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 795-825.
- Englander, S. W. & Poulsen, A. (1969) *Biopolymers* **7**, 329-339.
- Englander, S. W. & Kallenbach, N. R. (1984) *Q. Rev. Biophys.* **16**, 521-655.
- Englander, S.W. & Mayne, L. (1992) *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**, 243-265.
- Eriksson, E., Basse, W.A., Zhang,X.-J., Heinz, D.W., Blaber, M., Baldwin,E.P. & Matthews, B.W. (1992) *Science* **255**, 178-183.
- Ernst, R. R., Bodenhausen, G. & Wokaun, A. (1987) *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in one and two dimensions*, Oxford University Press, New York.
- Fairman, R., Shoemaker, K. R., York, E.J., Stewart, J.M. & Baldwin, R.L. (1990) *Biophys. Chem.* **37**, 107-119.
- Forman-Kay, J., Clore,G.M. & Gronenborg, A.M. (1992) *Biochemistry* **31**, 3442-3452.
- Glasstone, S., Laidler, K.J. & Eyring, H. (1941) *The Theory of Rate Processes*. Mc Graw Hill. New York.
- González, C. (1991) *Espectroscopía de RMN bidimensional. Estructura tridimensiional de proteínas*, Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Goodman, E. M. & Kim, P. S. (1991) *Biochemistry* **30**, 11615-11620.
- Gooley, P. R., Caffrey, M. S.,Cusanovich, M. A. & Mackenzie, N. E. (1992) *Biochemistry* **31**, 443-450.
- Goto,Y, Calciano, L.J. & Fink, A.K. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 573-577.

- Gregory R. B., Knox, D.J., Percy, A.J. & Rosenberg, A. (1982) *Biochemistry* **21**, 6523-6529.
- Hansen, P. E. (1991) *Biochemistry* **30**, 10457-10466.
- Hahn, U., Desai-hahn, R. & Rüterjans, H. (1985) *Eur. J. Biochem.* **146**, 705-712.
- Hahn, U. & Rüterjans, H. (1985) *Eur. J. Biochem.* **152**, 481-491.
- Hermans, J. & Scheraga, H. A. (1961) *J. Amer. Chem. Soc.* **83**, 3283-3292.
- Hol, W., Halie, L. & Sander, C. (1981) *Nature (London)* **294**, 332-336.
- Hore, P. J. (1989) *Methods in Enzymol.* **176**, 64-77.
- Hvidt , A. & Nielsen, S. O. (1966) *Adv. Protein Chem.* **21**, 287-386.
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1983) *Eur. J. Biochem.* **131**, 9-15.
- Jardetzky, O. & Roberts, G. C. K. (1981) en *NMR in Molecular Biology*, pp 333-345, Academic Press, New York.
- Jeng, M. F. & Englander, S. W. (1991) *J. Mol. Biol.* **221**, 1045-1061.
- Jenner, J., Meier, B. H., Bachman, P. & Ernst, R.R. (1979) *J. Chem.Phys.* **71**, 4546-4553.
- Kellis, J. T. Jr, Nyberg, K., Sali, D. & Fersht, A.R. (1988) *Nature (London)* **333**, 784-786.
- Kellis, J. T. Jr, Nyberg, K. & Fersht, A.R. (1989) *Biochemistry* **28**, 4914-4922.
- Kessler, H., Oschkinat, H., Griesinger, C. & Bermel, W. (1986) *J. Magn. Reson.* **70**, 106-133.
- Kim, E. E., Varadarajan, R., Wyckoff, H. W. & Richards, F. M. (1992) *Biochemistry* **31**, 12304-12314.
- Kim, P. S. & Baldwin, R. L. (1982) *Biochemistry* **21**, 1-4.
- Kohda, D., Sawada, T. & Inagaki, F. (1991) *Biochemistry* **30**, 4896-4900.
- Kosiakoff, A. A. (1982) *Nature (London)* **296**, 713-721.

- Kraulis, P. J. (1991) *J. Appl. Chrystallogr.* **24**, 946-950.
- Kumar, A., Ernst, R. R. & Wüthrich, K. (1980) *Biochem Biophys. Res. Commun* **95**, 1-6.
- Kuwajima, K. & Baldwin R. L. (1983 a) *J. Mol. Biol.* **169**, 281-297.
- Kuwajima, K. & Baldwin R. L. (1983 b) *J. Mol. Biol.* **169**, 299-323.
- Kuwajima, K. (1989) *Proteins* **6**, 87-103.
- Labhardt, A. M. (1982) *J. Mol. Biol.* **157**, 357-371.
- Laidler, K. J. (1950) *Chemical Kinetics*, McGraw-Hill, New York.
- Lang, K., Wrba, A., Krebs, H., Schmid, F.X. & Beintema, J.J. (1986) *FEBS-Lett.* **204**, 135-139.
- Lang, K. & Schmid, F.X. (1986) *Eur.J. Biochem.* **159**, 275-281.
- Lee, B & Richards, F. M. (1971) *J. Mol. Biol.* **55**, 379-400.
- Lehninger, A.J. (1988) *Principios de Bioquímica (3ª Ed.)* Ed. Omega, Barcelona.
- Lenstra, J. A., Bolscher, G.J.M., Stob, S., Beintema, J. & Kaptein, R. (1979) *Eur. J. Biochem.* **98**, 385-397.
- Levinthal, C. (1968) *J. Chem. Phys.* **65**, 44-45.
- Lian, L. Y. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**, 1253-1259.
- Lifson, S & Roig, A. (1961) *J. Chem. Phys.* **34**, 1963-1974
- Lu, J. & Dahlquist, F. (1992) *Biochemistry* **31**, 4749-4756.
- Macura, S & Ernst, R.R. (1980) *Mol. Phys.* **41**, 95-117.
- Marion, D. & Wüthrich, K. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **113**, 967-974.
- Markley, J.L. (1973) *Biochemistry* **12**, 2245-2249.
- Matouscheck, A., Kellis, J. T., Serrano, L & Fersht, A. R. (1989) *Nature (London)* **340**, 122-126.

- Matthew, J. B. & Richards, F. M. (1982) *Biochemistry* **21**, 4989-4999.
- Matthew, J. B. & Richards, F. M. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 3039-3044.
- Molday, R. S., Englander, S.W. & Kallen, R.G. (1972) *Biochemistry* **11**, 150-158.
- Nagayama, K., Kumar, A., Wüthrich, K. & Ernst, R. R. (1980) *J. Mag. Reson.* **40**, 321-334.
- Neuhaus, D. & Williamson, M. (1989) *The Nuclear Overhauser Effect in structural and conformational analysis*, VCH Publishers, New York.
- Niu, C. H., Matsura, S., Shindo, H. & Cohen, J.S. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 3788-3796.
- Oppenheimer, N.J. (1989) *Meth. in Enzymol.* **176**, 78-93.
- Pace, C. N., Laurents, D. V. & Thomson, J.A. (1990) *Biochemistry* **29**, 2564-2572.
- Paterson, Y., Englander, S.W. & Röder, H. (1990) *Science* **249**, 755-759.
- Pedersen, T.G., Sigurrskjold, B. W., Andersen, K.V. Kjaer, M., Poulsen, F.M. , Dobson, C.M. & Redfield, C. (1991) *J. Mol. Biol.* **218**, 413-426.
- Perrin, C. & Arrhenius, G. (1982) *J. Amer. Chem. Soc.* **104**, 6693-6696.
- Perutz, M. (1978) *Science* **201**, 1187-1191.
- Plateau, P & Guéron, M. (1982) *J. Amer. Chem Soc.* **104**, 7310-7311.
- Privalov, P.L. (1979) *Adv. Protein. Chem.* **33**, 137-241.
- Privalov, P.L. & Gill, S.J. (1988) *Adv. Protein. Chem.* **39**, 191-234.
- Radford, S.H. , Buck, M., Topping, K. D., Bobson, C. M. & Evans, P. A. (1992) *Proteins* **14**, 237-248.
- Richards, F.M. & Wyckoff, H. W. (1971) *Bovine Pancreatic Ribonuclease* (Capítulo 24) en *The Enzymes*. (Boyer, P.D., Ed) Vol 4., pp 647-806. Academic Press. New York.
- Rico, M., Nieto, J. L., Santoro, J., Bermejo, F. J., Herranz, J. & Gallego, E. (1983) *FEBS Lett* **162**, 314-319.

- Rico, M., Gallego, E., Santoro, J., Bermejo, F.J., Nieto, J.L. & Herranz, J. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **123**, 757-763.
- Rico, M., Bruix, M., Santoro, J., González, C., Neira, J.L., Nieto, J.L. & Herranz, J. (1989) *Eur. J. Biochem.* **183**, 623-638.
- Rico, M., Santoro, J., González, C., Bruix, M., Neira, J.L., Nieto, J.L. & Herranz, J. (1991) *J. Biomol. NMR* **1**, 283-298.
- Rico, M., Santoro, J., González, C., Bruix, M., Neira, J.L. & Nieto, J.L. *J. Appl. Magn. Reson.*, 1993.
- Robertson, A. D., Purisima, E. O., Eastman, M. A. & Scheraga, H. A. (1989) *Biochemistry* **28**, 5930-5938.
- Robertson, A. D. & Baldwin, R.L. (1991) *Biochemistry* **30**, 9907-9914.
- Roder, H. Wagner, G. & Wüthrich, K. (1985 a) *Biochemistry* **24**, 7396-7407.
- Roder, H. Wagner, G. & Wüthrich, K. (1985 b) *Biochemistry* **24**, 7407-7411.
- Roder, H. (1989) *Meth. in Enzymol.* **176**, 446-477.
- Rosa, J. J. & Richards, F.M. (1979) *J. Mol. Biol.* **133**, 399-416.
- Roy, S., Dibello, C. & Taniuchi, H. (1986) *Int. J. Pept. Protein Res.* **27**, 165-174.
- Saito, T., Duly, D. & Williams, R.J.P. (1991) *Eur. J. Biochem.* **197**, 39-42.
- Santoro, J., Juretschke, H. P. & Rüterjans, H. (1979) *Biochem. Biophys. Acta* **578**, 346-356.
- Santoro, J., González, C., Bruix, M., Neira, J. L., Nieto, J. L., Herranz, J. & Rico, M. (1993) *J. Mol. Biol.* en prensa.
- Schechter, A. N., Sachs, D. H., Heller, H.R., Shraeger, R. I. & Cohen, J. S. (1972) *J. Mol. Biol.* **71**, 39-48.
- Scheraga, H. A. (1980) en *Protein Folding* (Jaenicke, R, Ed.) pp 261-288. Elsevier, Amsterdam.
- Scheraga, H. A., Konishi, Y., Rothwarf, D. M. & Mui, P. W. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5740-5744.

- Schreier, A.A. & Baldwin, R.L. (1977) *Biochemistry* **16**, 4203-4209.
- Schmid, F. X. & Blascheck, R. (1984) *Biochemistry* **23**, 2128-2133.
- Schmid, F. X. (1986) *FEBS-Lett.* **198**, 217-220.
- Schmid, F. X., Grafl, R., Wrba, A. & Beintema, J. J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 872-876.
- Schoenborn, B. P. (1985) *Biophys J.* **47**, 34-45.
- Serrano, L. & Fersht, A.R. (1989) *Nature (London)* **342**, 296-299.
- Skelton, N. J., Kördel, J., Akke, M. & Charin, W.J. (1992) *J. Mol. Biol.* **227**, 1100-1117.
- Sober, H. (1968) *Handbook of Biochemistry*, The Chemical Rubber Company, Ohio.
- Spiridonov, V. P. & Lopatkin, A. A. (1983) *Tratamiento matemático de datos físico-químicos*, Ed. Mir, Moscú.
- Svensson, L. A., Sjölin, L., Gilliland, G. L., Finzel, B. C. & Wlodawer, A. (1986) *Proteins* **1**, 370-375.
- Tandford, C., Hauenstein, J. D. & Rands, D. G. (1955) *J. Amer. Chem. Soc.* **77**, 6409-6415.
- Tandford, C. & Hauenstein, J. D. (1956) *J. Amer. Chem. Soc.* **78**, 5287-5291.
- Tanford, C. (1962) *Adv. Prot. Chem.* **17**, 69-165.
- Tsong, T.Y., Baldwin, R.L. & Mcphie, P. (1972) *J. Mol. Biol.* **63**, 453-475.
- Tüschén, E. & Woodward, C. (1985 a) *J. Mol. Biol.* **185**, 405-419.
- Tüschén, E. & Woodward, C. (1985 b) *J. Mol. Biol.* **185**, 421-430.
- Udgaonkar, J. B. & Baldwin, R.L. (1988) *Nature (London)* **335**, 694-699.
- Udgaonkar, J. B. & Baldwin, R.L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8197-8201.
- Varadarajan, r & Richards, F. M. (1992) *Biochemistry* **31**, 12315-12327.

- Wagner, G. (1983) *Q. Rev. Biophys.* **16**, 1-57.
- Walters, D. E. & Allerhand, A. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 6200-6204.
- Wand, A. J., Roder, H. & Englander, S.W. (1985) *Biochemistry* **25**, 1107-1114.
- Wearne, S. J. & Creighton, T. E. (1988) *Proteins* **4**, 251-261.
- Wlodaver, A. & Sjölin, L. (1983) *Biochemistry* **22**, 2720-2728.
- Wlodaver, A. , Svensson, L. A., Sjölin, L. & Gilliland, G. L. (1988) *Biochemistry* **27** 2705-2717.
- Woodward, C. K. & Rosenberg, A. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **66**, 1067-1074.
- Wüthrich, K., Strop, P., Ebina, S. & Wilianson, M. P. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122**, 1174-1178.
- Wüthrich, K. (1986) *NMR of Proteins an Nucleic Acids*, J. Wiley and Sons, New York.
- Wyman, J. & Gill, S. J. (1990) *Binding and Linkage*, University Science Books, California.
- Zimm, B. H. & Bragg, J. K. (1959) *J. Chem. Phys.* **31**, 526-535.